



**FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE OBSTETRÍCIA Y GINECOLOGÍA**

TESIS DOCTORAL

**PAPEL DEL ESTRÉS OXIDATIVO EN LAS
TÉCNICAS DE FIV EN PACIENTES CON
ENDOMETRIOSIS**

**Laura Prieto Sánchez
MADRID, 2010**

DIRECTOR: Juan Antonio García Velasco

A mis padres

Por su apoyo incondicional y paciencia

AGRADECIMIENTOS

Al Profesor J.A García Velasco, director de esta tesis, por su inestimable apoyo en todo momento, por su paciencia y actividad docente, que han hecho posible esta tesis.

A la Dra. Carmen Cuadrado Mangas, por estar ahí en todo momento, por sus orientaciones y sus críticas constructivas.

A la Dra. Rosa Codoceo, del Departamento de Bioquímica del Hospital Universitario La Paz (HULP), por su ayuda a la hora de realizar todas las determinaciones, sus conocimientos y por prestarme parte de la infraestructura de su laboratorio.

A Juanfran y Olivia, que siguiendo las indicaciones de la Dra. Codoceo, se prestaron voluntarios para ayudarme con las determinaciones de laboratorio. Sin su ayuda hubiese resultado todo más difícil.

Al Departamento de Biología del Servicio de Esterilidad del HULP, especialmente a Juanma y Carolina, que han hecho posible la recogida de las muestras.

Al Departamento de Biología del IVI, y a todos aquellos, que aunque permanecieron en el anonimato para mí, me proporcionaron las muestras del IVI.

A Jesús Prieto, mi padre, por las horas entregadas con ilusión a las cuestiones de informática que me superaron.

A mi madre, M^a José, y mi hermana Irene, por apoyarme en los momentos donde pensé que iba a derrumbarme.

A mis compañeros de trabajo, porque juntos hemos superado muchos obstáculos, pero sobre todo, por su amistad.

Y por último, pero no menos importante, al Profesor Juan Ordás. Por su apoyo a lo largo de toda mi formación y trabajo diario como tocoginecóloga, así como en la dirección de esta tesis.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	12
1.a. Epidemiología	13
1.a.1. Factores epidemiológicos	14
1.a.2. Factores genéticos	14
1.a.3. Factores ginecológicos	15
1.a.4. Factores inmunológicos	15
1.b. Etiopatogenia	15
1.b.1. Teoría del desarrollo <i>in situ</i>	16
1.b.2. Teoría de la Inducción	16
1.b.3. Teoría de la Implantación	16
1.b.4. Factores genéticos	19
1.b.5. Tóxicos medioambientales	19
1.b.6. Sistema inmunológico	20
1.c. Clínica	22
1.d. Tratamiento médico de la endometriosis	24
1.d.1. DIU de Levonorgestrel	25
1.d.2. Inhibidores de la Aromatasa	26
1.d.3. Drogas inmunomoduladoras	31
1.d.4. Inhibidores de la angiogénesis	31
1.d.5. Moduladores selectivos de los receptores de estrógenos	31
1.d.6. Moduladores selectivos del receptor de progesterona	32
1.d.7. Estatinas	32
Tratamiento de la esterilidad asociada a la endometriosis	33

Estrés oxidativo y Fertilidad	35
Radicales libres y antioxidantes	36
¿Cuáles son estos mecanismos de defensa frente a los ROS?	40
¿Qué papel juegan los ROS en el tracto genital femenino?	43
Papel de los ROS en la endometriosis	45
 <u>2. OBJETIVOS</u>	51
 <u>3. MATERIALES Y MÉTODOS</u>	54
3.1. Población de estudio. Sujetos	54
 3.2. Diseño del estudio	55
 3.3. Métodos	56
3.3.1. Método clínico	56
3.3.2. Método diagnóstico	58
3.3.3. Método bioquímico	59
3.3.4. Método estadístico	65
 <u>4. RESULTADOS</u>	67
4.1. Características de la muestra	67
4.1.1. Edad de las pacientes	68
4.1.2. Edad del varón	68
4.1.3. Años de esterilidad	69
4.1.4. Gestaciones previas	69
4.1.5. Hábito tabáquico	70

4.2. Tratamientos empleados en la estimulación ovárica.....	70
 4.3. Respuesta y resultados del tratamiento	72
4.3.1. Número de folículos mayores de 14 mm de diámetro.....	72
4.3.2. Número de ovocitos recuperados.....	73
4.3.3. Número de ovocitos maduros.....	74
4.3.4. Número de ovocitos fecundados	74
4.3.5. Número de embriones.....	75
4.3.6. Número de embriones de buena calidad	75
4.3.7. Embriones transferidos y embriones congelados	76
4.3.8. Tasa de gestación clínica	77
4.3.9. Número de sacos	77
4.3.10. Número de embarazos múltiples	78
4.3.11. Número de abortos.....	78
4.3.12. Número de embarazos ectópicos	78
 4.4. Estrés oxidativo y capacidad antioxidante en plasma y líquido	
folicular	79
4.4.1. Vitamina E.....	79
4.4.2. Vitamina C	80
4.4.3. Superóxido dismutasa.....	82
4.4.4. Lipoperóxidos (MDA).....	83
 4.5. Correlación entre la capacidad antioxidante y estrés oxidativo de	
plasma y líquido folicular con los resultados de las técnicas de FIV ...	84
4.5.1. Vitamina E.....	85
4.5.2. Vitamina C	87
4.5.3. Superóxido dismutasa	94

4.5.4. Lipoperóxidos (MDA).....	98
<u>5. DISCUSIÓN</u>	103
5.1. Características de la muestra	104
5.1.1. Edad de las pacientes	104
5.1.2. Edad del varón	105
5.1.3. Años de esterilidad.....	105
5.1.4. Gestaciones previas.....	105
5.1.5. Hábito tabáquico	106
 5.2. Tratamientos empleados en la estimulación ovárica	106
 5.3. Respuesta y resultados del tratamiento	109
 5.4. Estrés oxidativo y capacidad antioxidante en plasma y líquido folicular	112
 5.5. Correlación entre la capacidad antioxidante y estrés oxidativo de plasma y líquido folicular con los resultados de las técnicas de FIV...	117
 <u>6. CONCLUSIONES</u>	126
 <u>7. BIBLIOGRAFÍA</u>	129

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

IL:	Interleukina
TNF-α:	Factor de necrosis tumoral α
TGF-β:	Factor β de transformación de crecimiento
VEGF:	Factor de crecimiento endotelial vascular
NK:	Natural Killer
ACO:	Anticonceptivos hormonales
LNG:	Levonorgestrel
PG:	Prostaglandina
FSH:	Hormona folículo estimulante
MMP:	Metaloproteasas de la matriz
SERM:	Moduladores selectivos de los receptores de estrógenos
SPRM:	Moduladores selectivos de los receptores de progesterona
FIV:	Fecundación <i>in vitro</i>
ICSI:	Inyección intracitoplasmática
TRA:	Técnica de reproducción asistida
LF:	Líquido folicular
ROS:	Especies reactivas de oxígeno
RL:	Radical libre
SOD:	Superóxido dismutasa
GP:	Glutación peroxidasa
MDA:	Lipoperóxidos
LP:	Líquido peritoneal
HSG:	Histerosalpingografía
H₂O₂:	Peróxido de hidrógeno o agua oxigenada

EOD: Esterilidad de origen desconocido

rpm: Revoluciones por minuto

TAC: Capacidad total antioxidante

INTRODUCCIÓN

PAPEL DEL ESTRÉS OXIDATIVO EN LAS TÉCNICAS DE FIV EN

PACIENTES CON ENDOMETRIOSIS

1. INTRODUCCIÓN

La endometriosis se define por la presencia de estroma y glándulas endometriales funcionantes fuera de la cavidad uterina. Constituye tras la miomatosis la patología mas frecuente del sistema reproductor femenino. El endometrio ectópico tiene capacidad de adherirse, crecer, infiltrar e incluso diseminarse de forma similar al tejido maligno, pero sin cambios histológicos de malignidad. Se trata de una enfermedad no infecciosa con una respuesta similar de inflamación, fibrosis y formación de adherencias.

Clásicamente la endometriosis se ha dividido en dos grandes tipos: la adenomiosis, que se caracteriza por la presencia de focos ectópicos de endometrio en el espesor del miometrio, y la endometriosis propiamente dicha, que incluye al endometrio ectópico existente en cualquier otra localización del organismo. Hoy en día son dos entidades independientes. En la actualidad se habla de tres tipos clínico-evolutivos diferentes de enfermedad.

- *Endometriosis ovárica*: clínicamente, la de comportamiento más benigno y mejor pronóstico. Suelen presentarse como formaciones de color negrozco (conocidas como “quistes de chocolate”), a veces más rojas, y se conoce con el nombre de endometrioma. Histológicamente se caracteriza por presentar escaso epitelio glandular y estroma, con abundante infiltrado inflamatorio (tanto agudo como crónico), fibrosis y presencia de siderófagos.
- *Endometriosis peritoneal*: peor pronóstico que la anterior pero mejor que la endometriosis infiltrativa profunda. Se caracteriza por la ausencia de infiltrado inflamatorio y siderófagos, presentando abundante fibrosis e hiperplasia

mesotelial. Clínicamente se clasifican en lesiones típicas (nódulos de color rojo, negruzco, azulado o vino, induradas a veces, que sangran al contacto. Pueden ser desde pocos milímetros hasta varios centímetros) y lesiones atípicas (lesiones vesiculares blancas, manchas rojas en forma de llama...). Parece que estas lesiones son evolutivas y con el tiempo pueden dar lugar a las formas típicas de endometriosis

- *Endometriosis infiltrativa profunda*: la de peor pronóstico y la que menos responde al tratamiento médico. Son lesiones nodulares en el espesor del miometrio o de las estructuras anejas de soporte uterino, que se caracterizan por abundante epitelio glandular, estroma y células musculares lisas hipertrofiadas a su alrededor. No existe infiltrado inflamatorio ni fibrosis. Se diferencia de la adenomiosis clásica en que, a diferencia de ésta, donde el endometrio ectópico intramiometrial parece proceder por invaginación del endometrio eutópico intracavitario, en la endometriosis infiltrativa profunda, los nódulos endometriósicos, con ausencia de conexión con el endometrio eutópico y alejados con frecuencia de la unión endometriometrial, parecen proceder de una endometriosis peritoneal. Sería pues un paso mas avanzado de una endometriosis peritoneal, con infiltración de “fuera hacia adentro” de estructuras como útero, tabique recto-vaginal o fondo de saco de Douglas, entre otras.

1.a) EPIDEMIOLOGÍA

La prevalencia de la endometriosis es muy variable, dependiendo del tipo de lesión (típica o atípica), del método diagnóstico (visualización directa o biopsia con estudio anatomopatológico) y de la clínica (asintomática, infertilidad, dolor...) del grupo estudiado. Entre las mujeres de edad fértil se sitúa en torno al 5-25%, prevalencia que aumenta al 25-40% cuando el grupo estudiado corresponde a mujeres estériles.

Predomina en mujeres de raza blanca, y aparece con mayor frecuencia en la franja de edad entre los 30 y 40 años, siendo rara antes de la menarquia y después de la menopausia. En la endometriosis parece haber un componente hereditario, que podría corresponder con un patrón de herencia poligénica multifactorial. También hay evidencias de una mayor incidencia de la enfermedad en mujeres con anomalías anatómicas del aparato genital, quizás secundario a la menstruación retrógrada.

Parece existir, por tanto, factores genéticos, ginecológicos y epidemiológicos asociados a la endometriosis. Vamos a analizar más detalladamente cada uno de ellos[1].

1.a.1.FACTORES EPIDEMIOLÓGICOS

Con respecto a la edad, ya hemos dicho que la prevalencia es mayor en la franja de edad entre 30-40 años, aunque el diagnóstico es más común entre los 25-29 años, siendo rara antes de la menarquia o después de la menopausia.

La enfermedad es más común en mujeres de raza blanca y nivel socioeconómico alto, si bien este concepto actualmente está en revisión, pues es posible que la mayor prevalencia de la enfermedad en estos estatus sociales se deba a la mayor demanda de asistencia médica, lo que sería responsable de un diagnóstico más frecuente y temprano. Estudios de prevalencia también parecen encontrar un mayor número de enfermas entre mujeres de raza asiática que de raza caucásica.

1.a.2.FACTORES GENÉTICOS

Ya en 1943 se publicó la primera comunicación de familias con endometriosis. Más tarde, han aparecido diversos trabajos que apoyan también una asociación familiar. Así, en 1980, Simpson y cols. describieron cómo hasta casi un 15% de las pacientes con endometriosis tenía un familiar de primer grado afectado de la enfermedad (madre o hermana), y cómo el riesgo de padecer la enfermedad entre los descendientes de primer orden de familias con historia de endometriosis estaba incrementado hasta diez veces.

Si bien parece, por tanto, existir una asociación familiar, hasta ahora no se ha encontrado un patrón de herencia mendeliano, y parece que pudiera corresponder a un patrón de herencia poligénico multifactorial [2-5].

1.a.3 FACTORES GINECOLÓGICOS

Las mujeres con ciclos menstruales cortos (intervalos < 21 días), prolongados (duración del sangrado > 7 días) y abundantes (> 150 gramos), tienen más riesgo de padecer la enfermedad.

La presencia de anomalías anatómicas, como tabique vaginal transverso, vagina hipoplásica o agenesia vaginal o cervical, y, en general, aquellas anomalías que suponen una obstrucción al flujo menstrual, se asocian con mayor frecuencia a la endometriosis, secundaria parece ser a la presencia de menstruación retrógrada.

No obstante, volvemos aquí a la importancia de otros factores en la patogénesis de la enfermedad, pues hallamos menstruación retrógrada en muchas mujeres, y sólo una minoría de ellas desarrollan la enfermedad [6, 7].

1.a.4.FACTORES INMUNOLÓGICOS

Por último, destacamos también la importancia de los factores inmunológicos, pues como veremos posteriormente al hablar de la etiopatogenia, en la endometriosis se ha podido demostrar una alteración tanto de la inmunidad celular como humoral.

1.b) ETIOPATOGENIA

Son muchas las teorías que se han propuesto para explicar el origen de la endometriosis. Los tres conceptos fundamentales en los que se basan estas teorías son: a) que la endometriosis puede originarse en el sitio en el que se diagnostica (**Teoría del desarrollo *in situ***), b) que puede originarse por diferenciación de células mesenquimales, activadas por sustancias liberadas por el endometrio en degeneración

que llega a la cavidad peritoneal (**Teoría de la inducción**) y c) que su origen puede estar en la diseminación de células endometriales viables durante la menstruación retrógrada a través de las trompas de Falopio hasta la cavidad peritoneal, implante y posterior desarrollo de la endometriosis (**Teoría del implante**) [8].

1.b.1.TEORÍA DEL DESARROLLO *IN SITU*

Según esta teoría, la endometriosis se originaría a partir de restos müllerianos o del conducto de Wolff, o por metaplasia del epitelio celómico del tejido peritoneal u ovárico en glándulas de tipo endometrial. La teoría de la metaplasia es más aceptada que la primera, puesto que puede explicar el origen de la endometriosis con independencia de su localización. Así, podría explicar los casos de endometriosis en niñas prepúberes, en mujeres que nunca han menstruado e incluso en varones, y la localización en ocasiones de lesiones endometriósicas en lugares tan poco frecuentes como muslo, rodilla...donde es imposible que llegue el flujo menstrual retrógrado.

1.b.2.TEORÍA DE LA INDUCCIÓN

El endometrio en degeneración que llega a la cavidad peritoneal liberaría determinadas sustancias que inducen el desarrollo de lesiones endometriósicas a partir de células totipotenciales del tejido conectivo.

1.b.3.TEORÍA DE LA IMPLANTACIÓN

Para poder aceptar esta teoría debe existir **menstruación retrógrada**, que debe contener células endometriales viables, y estas células, una vez en la cavidad peritoneal, deben ser capaces de **adherirse** al peritoneo y posteriormente implantarse y proliferar.

A favor de esta teoría están los hechos de que: a) la enfermedad es más frecuente en mujeres con flujo menstrual retrógrado, como mujeres con anomalías funcionales o anatómicas que supongan un obstáculo a la salida del flujo menstrual,

mujeres con menstruaciones abundantes y/o prolongadas, y b) la localización mas frecuente de las lesiones se sitúa en las zonas que normalmente baña el reflujo menstrual, como los ligamentos uterosacros, ovarios y fondo de saco de Douglas. Sin embargo, muchas mujeres presentan menstruación retrógrada y no todas sufren endometriosis. Podría haber factores genéticos o inmunológicos que influyan sobre la susceptibilidad de la enfermedad. Otras localizaciones como en pulmón, sistema nervioso central, cicatriz de cesárea, episiotomía...podría explicarse por la diseminación linfática o hematógena de las células endometriales, o por extensión directa [9].

- *Menstruación retrógrada*

La sangre menstrual puede fluir de forma retrógrada a través de las trompas de Falopio hacia la cavidad peritoneal. Esta sangre, en efecto, con frecuencia contiene células endometriales viables.

- *Adhesión celular*

Cuando las células endometriales llegan a la cavidad peritoneal deben adherirse al mesotelio peritoneal. Entre las moléculas de adhesión implicadas están las integrinas (contacto célula-matriz extracelular) y las caderinas (contacto célula-célula).

Las células endometriales recuperadas del flujo menstrual o del líquido peritoneal, del mismo endometrio o de las lesiones endometriósicas, expresan estas moléculas de adhesión, pero este hecho no es suficiente para confirmar que la endometriosis se origina por menstruación retrógrada, pues, por un lado, la expresión de moléculas de adhesión está modulada por los esteroides ováricos, y por tanto oscila a lo largo del ciclo menstrual, y por otro, es poco probable que una única molécula sea clave en el proceso.

Otra cuestión que está en discusión es si las células endometriales son capaces de adherirse a un peritoneo intacto o si es preciso que la matriz extracelular esté expuesta para iniciarse el proceso de adhesión. Aquí entran en controversia los

trabajos de *Witz*, quién defiende que el mesotelio intacto no se comporta como una barrera impenetrable, y que las moléculas de adhesión celular de la superficie mesotelial están implicadas en la patogénesis de la enfermedad, y *Dunselman*, quién afirma que un mesotelio intacto previene la adhesión, y que es el daño de esta barrera la que expondría la matriz extracelular haciendo posible el proceso de adhesión [10-13]. Lo que si parece evidente es que en el desarrollo de la endometriosis peritoneal, la alteración del equilibrio entre la “invasión” del tejido endometrial y los mecanismos de defensa intraperitoneales (actividad proteolítica del líquido peritoneal, que afectaría a la estructura y función de las moléculas de adhesión de las células endometriales que alcanzan la cavidad peritoneal, con la consiguiente reducción en la adherencia celular) es con mucha probabilidad un componente fundamental en la fisiopatología de la enfermedad.

- **Muerte celular o apoptosis**

Entre los mecanismos de defensa intraperitoneales que pueden contribuir al desarrollo inicial de la endometriosis o a su detención está la muerte celular programada.

Existen dos grandes familias de genes implicadas en la muerte celular, ya bien sea mediante la activación de genes de la familia Bax/Bcl-2 o bien a través de receptores de membrana celular como el sistema Fas/Fas ligando. En el endometrio estas dos familias, no sólo se expresan, sino que pueden ser moduladas a lo largo del ciclo menstrual por esteroides sexuales e incluso diversas citoquinas pueden estimular su expresión. También se ha visto cómo las células endometriales de mujeres con endometriosis y de las propias lesiones endometriósicas tienen una sensibilidad reducida a la apoptosis, lo que podría perpetuar su supervivencia y crecimiento, y favorecer el establecimiento de la lesión endometriósica [14-16].

1.b.4.FACTORES GENÉTICOS

Se sabe desde hace tiempo que la endometriosis tiene una asociación familiar, como confirman numerosos estudios poblacionales, clínicos o incluso a nivel familiar. Un paso más adelante consiste en buscar los genes implicados en la enfermedad. Se han buscado mediante marcadores polimórficos las regiones del genoma que puedan estar afectadas estudiando familias afectadas de endometriosis. Recientemente se ha descrito una región en el cromosoma 10 (10q26) donde se alojaría un locus de susceptibilidad de la enfermedad [4].

Algunos de los genes que se han descrito están relacionados con enzimas con función detoxificadora (lo que puede aumentar la sensibilidad a tóxicos medioambientales) o con genes de supresión tumoral.

1.b.5.TÓXICOS MEDIOAMBIENTALES

El primer trabajo que se publicó sobre la importancia de la contaminación ambiental en el desarrollo de la endometriosis surgió de Bélgica, país donde existe la mayor contaminación ambiental por dioxinas y también la mayor incidencia de endometriosis y la mayor prevalencia de endometriosis severa, aunque posteriores estudios no han podido confirmar definitivamente esta asociación. No obstante, el tratamiento con dioxinas a primates durante varios años estimuló el desarrollo de endometriosis, con efecto dosis-dependiente.

Sin embargo, dado que estamos expuestos continuamente a múltiples contaminantes ambientales a lo largo de nuestra vida, así como una especial vulnerabilidad genética, encontrar un vínculo único y definitivo va a ser difícil.

1.b.6. SISTEMA INMUNOLÓGICO

Mención especial merecen las alteraciones del sistema inmunológico que se han descrito en la endometriosis, al cobrar cada vez más importancia la participación del sistema inmunológico en la patogenia de la enfermedad.

Estudios recientes se han dedicado a los mecanismos que participan en la adherencia o depuración de endometrio viable de la cavidad pélvica. Se han señalado alteraciones de la respuesta inmunitaria a este tejido en la génesis y mantenimiento de la lesión endometriósica.

- Leucocitos del líquido peritoneal: se ha demostrado un aumento en la concentración de leucocitos, a expensas sobre todo de macrófagos, linfocitos T helper y células Natural Killer, en el líquido peritoneal de mujeres con endometriosis grado I y II. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en la concentración de leucocitos en enfermas con estadios III y IV de la enfermedad. Así, en estadios leves de la enfermedad la cantidad de células y leucocitos en el líquido peritoneal, así como su citotoxicidad, es mayor que en la endometriosis severa, lo que demuestra que los estadios iniciales o leves serían histológicamente los mas activos y los severos no mostrarían mas que la cronicidad de la enfermedad.
- Macrófagos, linfocitos y producción de citoquinas: se cree que los macrófagos hiperactivados en el líquido peritoneal contribuyen a la patogenia de la endometriosis, al secretar factores de crecimiento y citoquinas. Se ha descrito un aumento en la concentración de diversas citoquinas producidas por los macrófagos en el líquido peritoneal en pacientes con endometriosis, como interleuquina 1 (IL 1) y TNF- α (factor de necrosis tumoral-alfa), importantes citoquinas proinflamatorias, IL 6 e IL 8, que participan en el crecimiento, diferenciación y activación de muchas células inmunocompetentes y en la angiogénesis. Además de una mayor actividad secretora, los macrófagos del líquido peritoneal en pacientes con endometriosis pueden tener alteraciones de

su ciclo vital, siendo más resistentes a la apoptosis. Otras citoquinas producidas por células T y macrófagos, con funciones activadoras del sistema inmune y proinflamatorias (como IL 10, TGF- β (factor beta de transformación del crecimiento), IL 4...) se encuentran también aumentadas en el líquido peritoneal de pacientes con endometriosis, y concretamente en etapas tempranas, al compararlas con pacientes control o con etapas avanzadas de la enfermedad. También se ha demostrado una disminución en la concentración de otras citoquinas con función supresora de la inmunidad celular, como IL 13.

- Citoquinas y endometriosis: el aumento de las citoquinas peritoneales en las pacientes con endometriosis podría contribuir al mantenimiento de la lesión endometriósica, así como a la formación de adherencias, pues muchas de ellas juegan un importante papel en la adherencia de células endometriales y la angiogénesis, como TNF- α y VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular), entre otras.
- Células Natural Killer: también se ha encontrado una menor actividad de las células Natural Killer en las pacientes con endometriosis, lo que supondría una alteración en la depuración del endometrio menstrual retrógrado de la cavidad peritoneal [1].

En resumen, una alteración en la inmunidad celular transmitida genéticamente o inducida por factores ambientales, predispone a la implantación ectópica de células endometriales en mujeres con un defecto del sistema de macrófagos/células Natural Killer peritoneales.

También se ha estudiado la posibilidad de que la endometriosis sea una enfermedad autoinmune. Esta hipótesis estaría apoyada en múltiples estudios que han demostrado anomalías funcionales en los linfocitos T y B, herencia familiar, cifras anormalmente elevadas de células T y B, así como una actividad reducida de las

células NK. Además se han descrito autoanticuerpos contra el endometrio. A su vez, parece que en estas pacientes la frecuencia de enfermedades autoinmunes es más frecuente que en mujeres no afectadas, lo que sugiere una participación del sistema inmune en el desarrollo de esta enfermedad.

En la actualidad se acepta que en la etiopatogenia de la endometriosis todos estos mecanismos podrían contribuir y, probablemente, el grado en que cada uno contribuye varíe en cada paciente. Las células endometriales se pueden diseminar por medios mecánicos, o podrían originarse por metaplasia, y los factores genéticos, inmunológicos o incluso se ha barajado la posibilidad de la participación de tóxicos medioambientales, podrían influir sobre la progresión de la enfermedad.

En conclusión, parece que una única teoría no explicaría totalmente la enfermedad, sino que varias teorías convergen en un mismo camino facilitando el desarrollo de la misma, ya sea peritoneal, ovárica o del tabique recto-vaginal.

1.c) CLÍNICA

La endometriosis se caracteriza fundamentalmente por dolor y esterilidad, aunque puede ser totalmente asintomática. El **dolor** puede manifestarse como dismenorrea, dispareunia (los más frecuentes), mas sugestivos de endometriosis cuando se presentan años después de menstruaciones y relaciones sexuales más o menos indoloras, dolor pélvico difuso, a veces crónico no relacionado con el ciclo menstrual, disquecia...[17]

La **esterilidad** es el otro gran protagonista de la endometriosis, llegando a diagnosticarse en un 30-60% de las parejas estériles a las que se les realiza una laparoscopia.

Los trastornos menstruales como *spotting* intermenstrual, hipermenorrea, hemorragias uterinas disfuncionales, y los síntomas derivados de otras localizaciones atípicas, completan el espectro clínico.

Una característica de la endometriosis es la *falta de correlación entre la intensidad de los síntomas*, especialmente el dolor, y la severidad de las lesiones; y es que en la endometriosis visible el dolor está determinado fundamentalmente por la profundidad de la infiltración, asociándose el dolor severo a la infiltración profunda. Por último, cabe decir que hasta un tercio de las pacientes con endometriosis no presentan sintomatología alguna.

Con respecto a la esterilidad asociada a la endometriosis, es aún discutible el mecanismo mediante el cual la endometriosis afecta a la fertilidad.

En la endometriosis moderada-severa (grados III y IV) no hay duda de que los factores de índole mecánico ejercen un efecto negativo sobre la fertilidad. De hecho, el tratamiento quirúrgico de la endometriosis severa produce un marcado aumento de la fertilidad al restituir la anatomía alterada de la pelvis, y el tratamiento médico tiene muy poco que ofrecer a las pacientes estériles con endometriosis severa.

Más discutido es la relación entre la endometriosis mínima o leve (grados I y II) e infertilidad. Diversas evidencias apoyan que, efectivamente, la endometriosis de mínima a leve afecta negativamente a la fertilidad. En primer lugar, se ha demostrado una disminución en las tasas de embarazo en mujeres con endometriosis mínima o leve. Por otro lado, se diagnostica endometriosis por laparoscopia en una proporción más alta de mujeres estériles que de mujeres fértiles. Se han postulado diversos mecanismos por los que la endometriosis mínima o leve puede afectar a la fertilidad. Una menor calidad del ovocito o embrión por una disfunción ovárica, una hiperproducción de prostaglandinas por los implantes, un aumento en la activación de los macrófagos peritoneales, podrían, entre otros, explicar la menor calidad embrionaria y menor tasa de implantación en las mujeres con endometriosis, que se reflejaría en menores tasas de embarazo.

La disfunción ovulatoria en estas mujeres puede ser debida a una secreción inadecuada de esteroides ováricos o a una función lútea insuficiente. Esta alteración

en la esteroidogénesis de las células de la granulosa podría afectar también a la foliculogénesis y a la función del cuerpo lúteo, así como a la movilidad de las trompas.

Una alteración en el mecanismo de fecundación es otro posible factor implicado en la infertilidad de las mujeres con endometriosis, quizás explicado por un incremento en la fagocitosis de los espermatozoides por los macrófagos peritoneales o a una sutil disfunción ovocitaria.

En resumen, en las mujeres con endometriosis, el crecimiento ovocitario y su maduración pueden estar alterados, lo que produce embriones de peor calidad, con menor capacidad de implantación. Sin embargo, la complejidad en la etiología de la infertilidad asociada a la endometriosis mínima, hace que exista una mayor controversia en el tratamiento de la esterilidad en estas mujeres y en los resultados de las distintas técnicas empleadas. El tratamiento médico tiene muy poco que ofrecer en las mujeres con endometriosis respecto a su infertilidad. La inducción de la ovulación con clomifeno, con gonadotropinas e inseminación artificial o la fecundación *in vitro*, son tratamientos efectivos en la mujer infértil con endometriosis mínima [18].

1.d) TRATAMIENTO MÉDICO DE LA ENDOMETRIOSIS

La dependencia de los implantes endometriósicos de los estrógenos ha suscitado la utilización de diversos tratamientos hormonales, con el objetivo de crear un ambiente parecido al de la menopausia o gestación en las pacientes con endometriosis, mediante la supresión de la producción hormonal ovárica, y consecuentemente, la atrofia de los implantes.

Como el tratamiento médico de la endometriosis no ha demostrado mejorar la fertilidad de estas pacientes, el objetivo de este tratamiento es disminuir el dolor asociado a la enfermedad. Se han usado diversos tratamientos con este propósito: anticonceptivos hormonales (ACO), progestágenos o sustancias con acción androgénica y agonistas de GnRH. Todas estas drogas son efectivas mientras se están usando, con una alta tasa de recurrencias al suspender el tratamiento, y ninguna

ha demostrado ser mejor que otra para el tratamiento de la endometriosis; la principal diferencia está en el perfil de seguridad y en los efectos secundarios [19].

En los últimos años se han desarrollado nuevos fármacos con efecto más selectivo sobre los implantes endometriósicos y menos efectos sistémicos. Estas incluyen el DIU de levonorgestrel (Mirena®), inhibidores de la aromatasa, drogas inmunomoduladoras, inhibidores de la angiogénesis, moduladores selectivos de los receptores de estrógenos (SERMs), moduladores selectivos de los receptores de progesterona (SPRMs) y estatinas [20-22].

1.d.1. DIU de levonorgestrel

Son cada vez más las publicaciones sobre el papel del DIU de levonorgestrel en el tratamiento de la endometriosis. Inicialmente se desarrolló como un anticonceptivo que libera levonorgestrel (LNG) en la cavidad uterina. Esta acción progestogénica sobre el endometrio induce su atrofia, aunque normalmente no produce supresión de la ovulación. El resultado es una hipomenorrea y una disminución de la dismenorrea.

En pacientes con endometriosis peritoneal, así como del tabique rectovaginal, los primeros estudios pilotos han demostrado una mejoría en el control del dolor, así como una disminución en el tamaño de los nódulos rectovaginales. Estudios donde se compara el uso del DIU-LNG con la conducta expectante después de la cirugía de la endometriosis sintomática, demuestran una disminución significativa en los *scores* de dismenorrea en el grupo de LNG.

Aunque el mecanismo de acción exacto del DIU-LNG no está claro, parece que este liberaría suficiente cantidad de LNG en el líquido peritoneal, actuando de forma local sobre los implantes peritoneales, lo cual podría estar mediado a través de receptores de estrógenos y progesterona, y muy probablemente, induciendo una decidualización. Como los niveles de LNG en

el líquido peritoneal son muy parecidos a los encontrados en plasma, esto sugiere un mecanismo principalmente hematológico por el que el LNG llegaría a la cavidad peritoneal [19].

1.d.2. Inhibidores de la aromatasa

La aromatasa es la enzima llave en la biosíntesis de estrógenos, y media la conversión de androstendiona y testosterona a estrona y estradiol. Ya desde 1995 se demostró su actividad en el tejido endometriótico. De este modo, la inhibición de la aromatasa parece ser una aproximación racional para el tratamiento de la endometriosis.

AROMATASA Y ENDOMETRIOSIS

En el ovario, el estrógeno biológicamente activo es el estradiol, y es producido desde el colesterol a través de una serie de pasos. La aromatasa cataliza el paso final en esta cadena; de androstendiona y testosterona a estrona y estradiol.

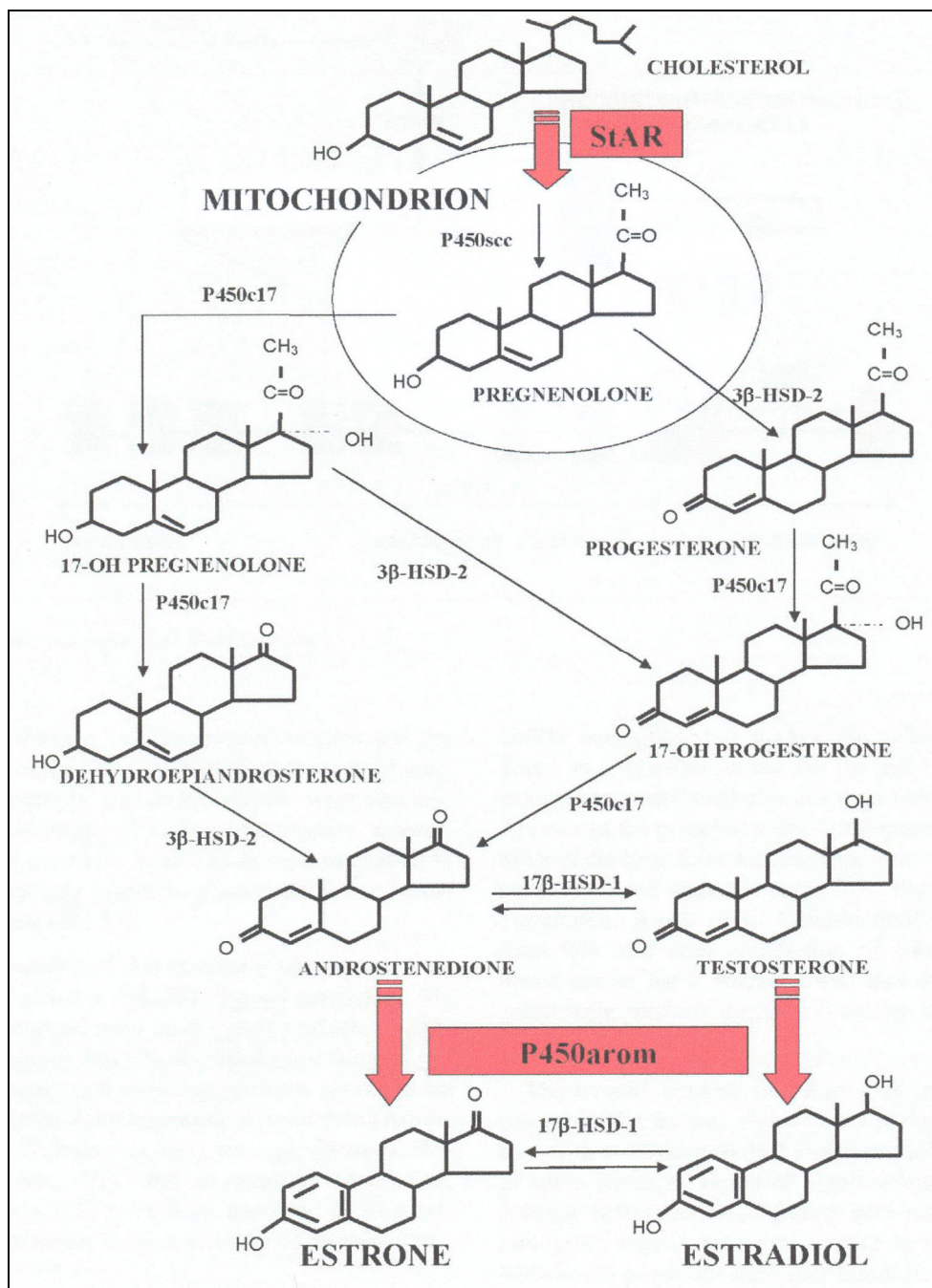


FIGURA 1. ESTEROIDOGÉNESIS OVÁRICA

La síntesis de estrógenos por la aromatasa no ocurre sólo en el ovario, sino también en un amplio número de tejidos del organismo (células de la granulosa ovárica, sincitiotrofoblasto, células de Leydig testiculares, así como en varios tejidos extraglandulares, incluyendo el tejido adiposo, cerebro y fibroblastos de la piel). La transcripción del gen de la aromatasa en los tejidos humanos está regulada por, al menos, diez promotores diferentes. Cada promotor es regulado por una vía de señalización diferente en cada tejido y da lugar a una amplia gama de enzimas aromatasas, con diferentes exones pero idéntica región codificadora.

El tejido endometriósico extraovárico y las células derivadas de los endometriomas ováricos usan casi exclusivamente el promotor II, el cual es el promotor proximal que responde a prostaglandina E2 (PGE2) y adenosina monofosfato (cíclico) para la expresión *in vivo* de la aromatasa. Así, la expresión aberrante de la aromatasa en la endometriosis está mediada principalmente por el promotor II.

Se han demostrado diversas anomalías moleculares en el endometrio de mujeres con endometriosis y en las lesiones endometriósicas, en contraste con el endometrio eutópico de pacientes sin enfermedad. Una anomalía clínicamente relevante es la presencia de niveles significativos de actividad aromatasa en el endometrio tanto eutópico como ectópico en pacientes con endometriosis. La PGE2 es el más potente inductor de la aromatasa en las células del estroma endometrial. La enzima ciclooxigenasa 2, que cataliza el paso clave en la conversión de ácido araquidónico en PGE2, está regulada al alza en las células del estroma del tejido endometriósico y del endometrio en pacientes que padecen la enfermedad. Adicionalmente, el producto de la aromatasa, el estradiol, es un potente estimulador de la ciclooxigenasa 2 en las células endoteliales uterinas. Así, existe un feed-back positivo que engloba a la aromatasa, estradiol, ciclooxigenasa 2 y PGE2, favoreciendo la continua

formación de estradiol y PGs en la endometriosis. En pacientes sin enfermedad, la expresión de la aromatasa es prácticamente indetectable en el endometrio.

FARMACOLOGÍA

Hay dos tipos de inhibidores de la aromatasa; los tipo I, esteroideos o no competitivos, y los tipo II, no esteroideos o competitivos. Los primeros, como el Exemestano, actúan bloqueando el enzima de forma irreversible. Los segundos, como el Anastrozol y Letrozol, bloquean el enzima de forma reversible, compitiendo con el sustrato por el sitio de acción. Como resultado, el bloqueo continuado requiere la presencia constante del inhibidor, y la efectividad del inhibidor competitivo depende de la afinidad del inhibidor y el sustrato.

INHIBIDORES DE LA AROMATASA EN EL TRATAMIENTO

Aproximadamente, la mitad de las pacientes con dolor crónico asociado a la endometriosis son refractarias a los tratamientos disponibles que crean un estado de hipoestronismo, incluyendo ACO, acetato de medroxiprogesterona, progestágenos orales y análogos de GnRh.

La cirugía conservadora de la endometriosis proporciona un alivio parcial del dolor, pero la respuesta varía ampliamente de una paciente a otra.

El fallo de estos tratamientos ha llevado a emplear los inhibidores de la aromatasa en el tratamiento de la endometriosis. La justificación se basa en que la producción continuada de estrógenos a nivel local en los implantes endometriósicos era en parte responsable de la resistencia a los tratamientos (por ej, los análogos de GnRh). Así, Anastrozol y Letrozol han sido usados con éxito en pacientes con endometriosis resistentes a tratamientos previos.

Sin embargo, como los inhibidores de la aromatasa no son capaces de inhibir totalmente la esteroidogénesis ovárica, e incluso en mujeres premenopáusicas pueden aumentar el reclutamiento folicular (la deplección de estrógenos produce una respuesta compensadora en el hipotálamo que aumenta la liberación de FSH, lo que produce la estimulación ovárica), se ha estudiado su uso en combinación con progestágenos, ACO o análogos de GnRh, para evitar este aumento de FSH y estimulación folicular.

En un estudio donde se usaron los inhibidores con progesterona se vio que esta combinación fue satisfactoria en disminuir significativamente el dolor y en reducir la endometriosis visible, en pacientes que no habían respondido o tolerado los tratamientos existentes o la cirugía.

La combinación de inhibidores de la aromatasa y ACO es también eficaz en el control del dolor, y reduce los *scores* de la cirugía laparoscópica de la endometriosis.

En un estudio donde se comparaba la combinación de inhibidores con análogos de GnRh frente a los análogos sólo, el tratamiento combinado aumentó significativamente el intervalo libre de dolor, sin los efectos negativos sobre el hueso que produce el uso de agonistas sólo.

Como conclusión, podemos decir que, en pacientes con endometriosis que no responden a los tratamientos existentes, se puede obtener una mejoría significativa del dolor con inhibidores de la aromatasa. Además, el perfil de efectos secundarios de los regímenes con inhibidores de aromatasa (incluyendo la combinación con progesterona o ACO) es más favorable comparado con los tratamientos que usan análogos de gr. o danazol. Así, algunos de estos regímenes podrían ser usados durante periodos prolongados [23].

1.d.3. Drogas inmunomoduladoras

Basándonos en los conocimientos de la patogénesis de la endometriosis, sabemos el papel que juega la inflamación en la enfermedad [24]. De este modo, el bloqueo selectivo de la producción de TNF- α parece ser una intervención eficaz.

En modelos animales se ha visto que la proteína transportadora de TNF- α es capaz de inhibir el desarrollo de la endometriosis [25, 26].

1.d.4. Inhibidores de la angiogénesis

El desarrollo de los implantes endometriósicos en la cavidad peritoneal requiere el establecimiento de un nuevo aporte sanguíneo. Así, la inhibición de los factores proangiogénicos (por ej. VEGF y MMPs [metaloproteasas de la matriz]) puede ofrecer nuevas oportunidades terapéuticas. La efectividad de estos compuestos en reducir el crecimiento de los focos endometriósicos se ha demostrado en modelos de ratón. Sólo se ha realizado un estudio en humanos que sugiere que el componente angiostático (e inmunomodulador) de la talidomida podría ser efectivo en mujeres con endometriosis recurrente [27].

1.d.5. Moduladores selectivos de los receptores α de estrógenos

Son los llamados SERMs, con efecto agonista parcial y antagonista estrogénico. El Raloxifeno es un SERM de segunda generación que ha demostrado disminuir el riesgo de fracturas osteoporóticas y parece prometedor para la prevención del cáncer de mama. A diferencia del tamoxifeno, SERM de primera generación, el Raloxifeno tiene un efecto antiestrogénico en el tejido endometrial. De este modo, el Raloxifeno podría llegar a ser una opción en el tratamiento de la endometriosis. Su efecto sobre la endometriosis en humanos no es aún conocido, pero en estudios animales el tratamiento con Raloxifeno produce una regresión de los implantes a dosis de

10 mg/Kg, lo cual es consistente con su observada actividad antiestrogénica en el tejido endometrial.

1.d.6. Moduladores selectivos del receptor de progesterona

Denominados SPRM. Asoprisnil, el primer SPRM en desarrollo, ha demostrado inducir una amenorrea reversible a través de la inhibición selectiva de la proliferación endometrial, y un efecto directo en los vasos sanguíneos sin los efectos sistémicos de la privación estrogénica. El mecanismo exacto del Asoprisnil sobre el endometrio aún no está bien determinado. A fecha de hoy, sólo hay un estudio publicado aleatorio y controlado con placebo, de Asoprisnil durante 12 semanas en mujeres con endometriosis diagnosticada por laparoscopia que tenían dolor pélvico moderado o severo. Todas las dosis de Asoprisnil reducen el dolor pélvico no menstrual, así como la dismenorrea; sin embargo, el efecto sobre el patrón de sangrado fue dosis-dependiente. También ha demostrado un perfil de seguridad y tolerabilidad favorable, sin los efectos de la privación estrogénica.

1.d.7. Estatinas

Las estatinas son un tratamiento no hormonal usado para reducir los niveles sanguíneos de colesterol, mediante la inhibición del enzima HMG-CoA reductasa. Tienen también otros potenciales efectos beneficiosos, como disminuir el riesgo de diabetes, demencia e incluso osteoporosis.

Un reciente informe demostró que las estatinas también inhiben el crecimiento de las células estromales endometriales humanas *in vitro*, lo que abre un nuevo y prometedor camino en el campo del tratamiento de la endometriosis [28].

TRATAMIENTO DE LA ESTERILIDAD ASOCIADA A LA ENDOMETRIOSIS

Tratamiento médico

Diversos estudios han demostrado que el tratamiento supresor de la ovulación con gestágenos, danazol o análogos de GnRH frente a placebo o no tratamiento en pacientes con esterilidad supuestamente debida a endometriosis tipo I o II no mejora la fertilidad en estas mujeres, y lo que sí producen es una imposibilidad de embarazo durante los meses que se aplican.

Tratamiento quirúrgico

Está demostrada la eficacia del tratamiento quirúrgico para restituir la distorsión anatómica que produce la endometriosis avanzada (grados III y IV). El tratamiento quirúrgico mejora las tasas de embarazo obtenidas en comparación con el tratamiento médico o la conducta expectante; sin embargo, esto se produce en pacientes con una endometriosis moderada o grave, que son las que más se benefician de este tipo de tratamiento. La situación es más controvertida en mujeres con estadios iniciales de endometriosis (grados I y II). En ellas, la destrucción de la endometriosis visible no contrarresta todos los mecanismos por los que esta enfermedad produce esterilidad. Por tanto, aunque la eficacia de la cirugía en el tratamiento de la esterilidad asociada a la endometriosis es un tema aún en discusión, la evidencia de la que disponemos en el momento actual señala un efecto beneficioso del tratamiento, si bien es probable que dicho efecto sea reducido [29].

Consideración aparte merece el manejo de los endometriomas ováricos. En una revisión publicada por el Dr. García Velasco en 2009 concluye que la cirugía laparoscópica del endometrioma previa a la técnica de FIV no ofrece mejores resultados, en cuanto a tasas de embarazo se refiere. Estos autores recomiendan recurrir directamente a la FIV para reducir el tiempo hasta conseguir un embarazo, reducir los costes del tratamiento y el potencial riesgo quirúrgico, y únicamente recurrir

a la cirugía en determinadas circunstancias, como el tratamiento concomitante del dolor refractario al tratamiento médico, quistes de gran tamaño o en el caso de que no se pueda descartar malignidad del quiste por ecografía [29].

Fecundación asistida

La inducción de la ovulación con clomifeno, el uso de gonadotropinas asociado o no a inseminación intrauterina y las técnicas de fecundación in vitro (FIV) o inyección intracitoplasmática (ICSI), son técnicas que han demostrado su eficacia en las pacientes con endometriosis.

Ya hemos comentado cómo el tratamiento quirúrgico de la endometriosis severa produce un marcado aumento de la fertilidad, al restituir la anatomía alterada de la pelvis. Sin embargo, en la endometriosis leve, la destrucción quirúrgica de los focos de endometriosis tan sólo produce un mínimo aumento de las tasas de embarazo en relación al tratamiento conservador. Cuando el tratamiento de la endometriosis fracasa, la aplicación de técnicas de reproducción asistida (TRA) ofrece una alta tasa de éxito. A veces se intenta una serie de ciclos de estimulación de la ovulación asociada a inseminación intrauterina, sin embargo, muchos autores recomiendan recurrir directamente a las técnicas de FIV o ICSI, aunque los criterios son variables en función de las características de cada pareja.

En mujeres mayores de 35 años, a veces no es conveniente demorar la indicación de una TRA, por lo que se puede recurrir directamente a ella si en un año la pareja no ha gestado.

ESTRÉS OXIDATIVO Y FERTILIDAD

Es evidente que las pacientes con endometriosis suelen tener peores resultados en las TRA. Se han estudiado diversos componentes del líquido folicular (LF), como citoquinas, factores de crecimiento y hormonas, y su posible influencia en el desarrollo ovocitario y calidad embrionaria, en un intento de buscar una explicación a la menor tasa de embarazo que se encuentra en estas pacientes.

El producto final del metabolismo oxidativo puede inducir la formación de moléculas en un estado electrónico activado, que tienen electrones libres y son altamente reactivas con otras moléculas de los sistemas biológicos. Globalmente, estas moléculas activadas derivadas del metabolismo oxidativo se denominan ROS (reactive oxygen species).

Estos ROS se pueden originar directamente en el embrión o en el microambiente que le rodea (leucocitos, células de la granulosa, células endoteliales...) [30].

Mientras que la producción controlada de ROS es necesaria para diversas funciones fisiológicas, los altos niveles de ROS pueden sobrepasar la capacidad antioxidante y causar daño por estrés oxidativo. Los ROS juegan un papel importante en procesos fisiológicos, como la remodelación tisular, maduración ovocitaria, foliculogénesis, funcionalidad tubárica, esteroidogénesis ovárica, cambios cíclicos endometriales y función de las células germinales. Sin embargo, si los niveles de ROS aumentan drásticamente, pueden producir daño de diversas estructuras. Se sabe que los ROS, como los radicales hidroxilo, anion superóxido y peróxido de hidrógeno (H_2O_2), tienen un efecto deletéreo sobre los ovocitos, pudiendo producir daño sobre la membrana celular, ADN y acelerar la apoptosis.

Diversos autores y estudios han centrado su interés en la relación entre estrés oxidativo y endometriosis. Sin embargo, los resultados son dispares y a veces no

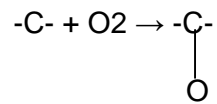
concluyentes, aunque todos encuentran una relación entre el estrés oxidativo y la patogenia y progresión de la enfermedad, así como su posible relación con la menor fertilidad en estas pacientes, especialmente en estadios iniciales de la enfermedad, donde el factor mecánico no suele justificarla por completo.

RADICALES LIBRES Y ANTIOXIDANTES

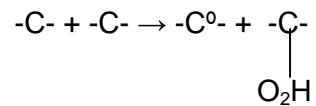
Un radical libre (RL) se define como una molécula que tiene uno o más electrones no apareados y que puede existir de forma independiente [31]. Los RL pueden reaccionar químicamente con moléculas similares o con no radicales. La reacción entre un RL y una molécula no radical presenta importantes características:

- La reacción entre ambas convierte la molécula no radical en una molécula radical.
- Esto hace que dichas reacciones tengan la tendencia a ser reacciones en cadena: un radical produce otro radical y así sucesivamente.
- La intensidad de la reactividad química es variable según el RL que intervenga. Así el radical hidroxilo (OH^\bullet) es el más reactivo. Ataca y daña casi todas las moléculas de las células y su entorno más próximo, conduciendo a una reacción en cadena que amplía el daño.

Así, por ej., el OH^\bullet puede atacar el ADN originando reacciones en cadena que afectan a las bases purina y pirimidina, lo que a su vez puede conducir a mutaciones genéticas o a cáncer. Otro ejemplo del daño que puede causar el OH^\bullet es su capacidad para destruir las membranas celulares en una reacción en cadena que se denomina **peroxidación de lípidos**. Esta ocurre cuando el OH^\bullet es generado cerca de las membranas y ataca las cadenas laterales de ácidos grasos de fosfolípidos de la membrana, dando como resultado un radical centrado en un carbono ($-\text{C}^\bullet$) en la membrana. Este radical comúnmente se combina con oxígeno, creando otro nuevo tipo de radical: el radical peroxilo.



El radical peroxilo puede reaccionar con otra cadena lateral de ácidos grasos, continuando la reacción en cadena para originar hidroxiperóxidos lípidos.



Estos hidróxidos lípidos alteran la fluidez de la membrana y pueden conducir a su ruptura o pueden originar productos citotóxicos que dañan las proteínas de las membranas, inactivan receptores, dañan mecanismos de transducción, proteínas de transporte etc...

Otros radicales son menos reactivos que el OH^\bullet , como el radical superóxido, el cual no ataca la mayoría de las moléculas biológicas.

Muchos de estos RL se producen como resultado final del metabolismo oxidativo. Hemos comentado cómo los ROS en altas concentraciones producen daño celular, lesionando organelas como las mitocondrias, el ADN nuclear y mitocondrial y las membranas celulares. Sin embargo, los ROS en pequeñas cantidades juegan un importante papel en diversas funciones celulares.

Para prevenir el daño inducido por los ROS las células tienen **sistemas antioxidantes**. Como resultado, hay un delicado balance entre la producción de ROS y la actividad antioxidante, que mantiene la homeostasis celular. Cuando se rompe este balance por un exceso en la producción de ROS, se crea un estado de estrés oxidativo que causa daño y disfunción celular.

Los antioxidantes

El organismo humano posee mecanismos para defender sus propias células de las lesiones que les pueden causar los RL, sean éstos generados como parte de los procesos metabólicos normales o anormales.

Existen dos líneas defensivas:

a) la primera compuesta por enzimas defensoras y por el secuestro de iones metálicos.

Las enzimas son la superóxido dismutasa (SOD), que remueve el radical superóxido, y las catalasas y glutatión peroxidasa (GP), que remueven el peróxido de hidrógeno. Esta última requiere el elemento selenio para su actividad.

El secuestro de iones metálicos se refiere principalmente a los iones cobre y hierro, los cuales están ligados a las proteínas ceruloplasmina y transferrina respectivamente. Estas proteínas mantienen normalmente secuestrados o ligados los iones, de manera que en condiciones normales no existen iones de hierro o de cobre libres en la circulación y no hay probabilidad de que generen radicales de hidroxilo.

b) La segunda línea defensiva de radicales la constituyen varias sustancias: el α -tocoferol o vitamina E, el ácido ascórbico o vitamina C, los carotenos o vitamina A, el glutatión, la tiamina y la cisteína.

El α -tocoferol funciona como un antioxidante que rompe la cadena. Actúa en la peroxidación de lípidos al reaccionar con el peroxirradical y convertirse en un radical tocoferol. Este radical reacciona pobremente y de este modo la reacción en cadena se detiene. Se ha encontrado que el α -tocoferol protege de la peroxidación a las lipoproteínas plasmáticas, LDLs, las cuales si se peroxidan contribuyen al desarrollo de aterosclerosis. Los carotenoides contribuyen de forma similar al α -tocoferol.

El glutatión juega un papel central en el mantenimiento de la malla antioxidante. Es sintetizado intracelularmente a partir de la cisteína, glicina y glutamato. Su

depleción como resultado del consumo aumentado o síntesis insuficiente puede conducir a depleción de otros antioxidantes como las vitaminas C y E.

Los **ROS** juegan un **papel** importante en el **tracto reproductor** y modulan varias funciones reproductivas [32, 33].

Los ROS pueden influir en los ovocitos, espermatozoides, embrión y su microambiente (líquido folicular y fluidos tubárico y peritoneal). Este microambiente que rodea al ovocito y embrión tiene una relación directa con la calidad ovocitaria, interacción ovocito-espermatozoide, implantación y desarrollo embrionario temprano. Así, los ROS afectan tanto al desarrollo embrionario precoz como a la implantación, y ambos mecanismos determinan el éxito del embarazo [30, 34].

Así, el estrés oxidativo ha surgido recientemente como uno de los factores más importantes que influyen negativamente en los resultados de las TRA. Los malos resultados obtenidos con frecuencia en estas técnicas podrían deberse a una falta *in vitro* de los mecanismos de protección natural del ovocito y embrión frente al estrés oxidativo. Se ha demostrado que las concentraciones de varios marcadores de estrés oxidativo son mayores en plasma que en LF, lo que sugiere que el LF cuenta con altas concentraciones de sistemas antioxidantes que protegen al ovocito del daño oxidativo [26].

El medio de cultivo *in vitro* difiere en distintos aspectos con respecto a las condiciones *in vivo*: la concentración de oxígeno es más alta *in vitro* (20%, mientras que en útero y trompas es aproximadamente del 5-8%), y en tales condiciones hay mayor concentración de ROS en el medio de cultivo. El ovocito está protegido frente al estrés oxidativo por distintos antioxidantes que están presentes *in vivo*. Sin embargo, cuando los ovocitos son recuperados de su ambiente natural para las TRA, estos mecanismos de defensa naturales se pierden.

¿CUÁLES SON ESTOS MECANISMOS DE DEFENSA FRENTE A LOS ROS?

La sobreproducción de ROS y la disminución de los mecanismos de defensa frente a los ROS producen un daño oxidativo.

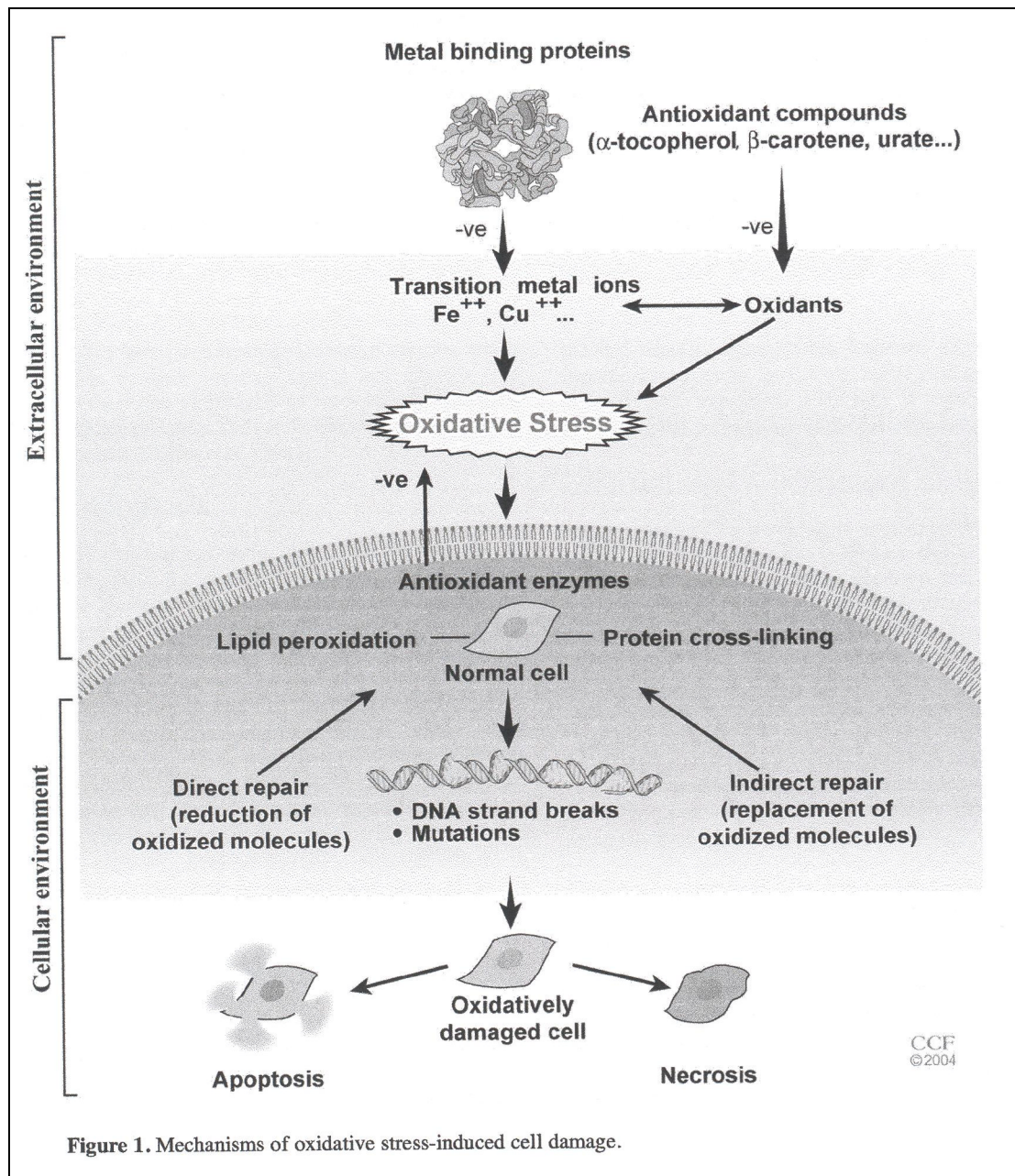


Figure 1. Mechanisms of oxidative stress-induced cell damage.

FIG. 1 MECANISMOS DE DAÑO CELULAR INDUCIDO POR ESTRÉS OXIDATIVO [35]

Para evitar el efecto deletéreo de los ROS, el ovocito y embrión son protegidos por antioxidantes presentes tanto en el LF como fluidos tubárico y peritoneal.

Existen diversos sistemas antioxidantes, que los podemos dividir en enzimáticos y no enzimáticos.

Como antioxidantes no enzimáticos tenemos la taurina e hipotaurina, la cisteína y algunas vitaminas como la vitamina C y E, presentes todos en el líquido folicular y en los fluidos tubárico y peritoneal.

La forma reducida de un antioxidante no enzimático, el glutatión, es el mecanismo más importante de defensa frente a los ROS en el ovocito y embrión. Unas altas concentraciones de glutatión protegen al embrión hasta el estadio de blastocisto, y se ha demostrado que la depleción de glutatión produce un estrés oxidativo que induce daño del ADN en el embrión.

La cisteína es otro antioxidante no enzimático, que se ha aislado en el líquido folicular de diversos animales, y en estudios con embriones bovinos y porcinos se ha visto un efecto beneficioso en el desarrollo y la maduración embrionaria cuando se añade al medio de cultivo.

Entre las vitaminas con función antioxidante encontramos el ácido ascórbico o vitamina C y la vitamina E. La primera neutraliza los radicales hidroxilos y peróxido de hidrógeno y previene la aglutinación de los espermatozoides. La vitamina E, presente dentro de las membranas celulares, neutraliza los grupos hidroxilos y anión superóxido, previniendo así la oxidación de los lípidos de las membranas celulares.

Entre los sistemas enzimáticos con que el ovocito y embrión cuentan para su protección frente al estrés oxidativo está la SOD, GP y la catalasa [36].

SISTEMAS ANTIOXIDANTES

NO ENZIMÁTICOS	ENZIMÁTICOS
Taurina	Superóxido-dismutasa (SOD)
Hipotaurina	Glutación peroxidasa (GP)
Cisteína	Catalasa
Vitamina C	
Vitamina A	
Glutation	

Todo ello ha llevado a diseñar una serie de **estrategias** para vencer el estrés oxidativo en las TRA.

Durante las TRA es importante imitar las condiciones *in vivo* evitando las situaciones que promueven la generación de ROS. Las estrategias disponibles incluyen:

- Conservar los medios de cultivo en condiciones de baja tensión de oxígeno.
- Suplementar los medios de cultivo con antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos. Se ha notificado una mayor tasa de implantación y embarazo cuando el medio de cultivo es suplementado con antioxidantes. Así, la adición al medio de vitamina C, vitamina E, taurina e hipotaurina, entre otros, se ha visto que reduce el daño oxidativo. También la adición de enzimas antioxidantes, como la SOD, al medio de cultivo previene el efecto deletéreo del estrés oxidativo sobre la viabilidad del espermatozoide y desarrollo del embrión.
- Control sobre el daño espermático. Los espermatozoides son especialmente susceptibles al daño inducido por los ROS, debido a que sus membranas contienen gran cantidad de ácidos grasos poliinsaturados y su citoplasma cuenta con bajas concentraciones de enzimas antioxidantes. El plasma seminal

es rico en antioxidantes y protege al espermatozoide del daño al ADN y peroxidación lipídica. Se ha demostrado que el método de preparación del esperma afecta a los resultados de las TRA. Así, la preparación del semen por centrifugación puede asociarse con la producción de ROS. La adición de distintos antioxidantes como taurina, vitaminas C y E y glutatión parece mejorar la motilidad espermática y la reacción acrosómica. De igual modo, la adición de SOD disminuye la rotura y daño de la cromatina espermática.

- Reducir el tiempo de coincubación del ovocito-espermatozoide, ya que el tiempo prolongado de coincubación aumenta la generación de ROS [31, 37].

¿QUÉ PAPEL JUEGAN LOS ROS EN EL TRACTO GENITAL FEMENINO?

Para que ocurra la ovulación son necesarios bajos niveles de ROS. Los ROS pueden jugar un papel regulador en la maduración del ovocito, foliculogénesis, esteroidogénesis y luteolisis.

Se han estudiado distintos marcadores de estrés oxidativo, como SOD, GP y los lípidos peroxidados (MDA) por análisis inmunohistoquímico y expresión del ARN-m en ciclos naturales y estimulados, y se ha confirmado su expresión en ciclo natural.

Diversos estudios han centrado su interés en el microambiente que rodea al ovocito, y han encontrado ROS y antioxidantes en el **líquido folicular**. El LF contiene una alta concentración de antioxidantes, que protegen al ovocito del daño inducido por los ROS. Por ello, un desbalance entre los ROS y los sistemas antioxidantes en el LF podría ser responsable de un desarrollo anormal del ovocito, causando daño en el ADN, el citoesqueleto y las membranas celulares, que se traduciría en una menor capacidad de fertilización del ovocito.

Paszkowski et al encontraron mayores concentraciones de GP en el LF de ovocitos que fueron fecundados que en aquellos que no lo fueron, sugiriendo así que en el microambiente que rodea al ovocito de mujeres estériles hay una menor capacidad antioxidante, que afectaría negativamente a la fecundación del ovocito [38].

Sin embargo, *Attaran et al* demostraron que las concentraciones de ROS en el LF guardaban una correlación positiva con las tasas de embarazo en pacientes sometidas a FIV, lo que sugiere que una mínima cantidad de estrés oxidativo es necesaria para una función reproductiva normal [39] .

De igual modo, se sabe que el **líquido peritoneal** (LP) juega un papel importante en el proceso normal de fecundación y desarrollo embrionario precoz. El LP contiene gran cantidad de células capaces de generar ROS, entre ellas los macrófagos peritoneales, pero también contiene numerosos sistemas antioxidantes para mantener los ROS en unos niveles fisiológicos. De hecho, se sabe que una mínima cantidad de ROS es necesaria para el proceso de fusión del espermatozoide con el ovocito, pero las concentraciones elevadas son dañinas para el espermatozoide. Así, las altas concentraciones de ROS en LP podrían explicar en parte la esterilidad primaria.

También el **embrión** cuenta con numerosos mecanismos para protegerse del estrés oxidativo, tanto generado por el mismo como por el microambiente que le rodea. Este microambiente que rodea al ovocito y al embrión cuenta con antioxidantes no enzimáticos como las vitaminas C y E, el glutatión, la taurina y la hipotaurina, que protegen al embrión de los ROS externos. De igual modo, el embrión cuenta también con múltiples sistemas antioxidantes internos, como GP, SOD y catalasa, para protegerle de los ROS generados durante su metabolismo.

Todos estos sistemas mantienen unos niveles fisiológicos de ROS en el embrión, pues los ROS a altas concentraciones se han relacionado con un desarrollo

embrionario defectuoso y un crecimiento más lento, atribuido al daño que ejercen en las membranas celulares, en el ADN y en la apoptosis. Esto limitaría las tasas de fecundación y el potencial de implantación [32-34].

PAPEL DE LOS ROS EN LA ENDOMETRIOSIS

En condiciones normales, los ROS facilitan la implantación y el desarrollo celular. En la cavidad peritoneal, los ROS pueden ser producidos por las células sanguíneas, por los macrófagos y por las células endometriales procedentes del reflujo menstrual.

Los macrófagos peritoneales han sido implicados en la patogénesis de la endometriosis [40]. Las células endometriales y sus detritus, así como los eritrocitos, provocan una activación de los macrófagos peritoneales. La activación de los macrófagos induce la producción de ROS, que al interactuar con las lipoproteínas dan lugar a la formación de MDA.

Muchos estudios se han centrado en el papel de los ROS y los antioxidantes en la patogenia de la enfermedad [24, 41-43]. Los resultados son dispares, pero la mayoría encuentran que las pacientes con endometriosis tienen disminuida la concentración de antioxidantes, tanto enzimáticos como no enzimáticos (vitaminas C y E), y aumentada la concentración de ROS, cuando se comparan con pacientes sin enfermedad [44].

Ota et al (1998) estudia las concentraciones de ROS en el endometrio, y encuentra que en pacientes con endometriosis hay una mayor concentración de ROS, que probablemente se pueda explicar por un aumento en las concentraciones de xantina oxidasa, enzima implicada en la producción de ROS. Las mujeres con enfermedad tienen una mayor expresión de esta enzima, tanto en el endometrio

eutópico como ectópico, de forma constante, mientras que las mujeres sin enfermedad sufren cambios cíclicos en las concentraciones de este enzima. Este mismo autor también encuentra niveles persistentemente elevados de otras dos enzimas, la SOD y GP, en el endometrio de pacientes con endometriosis, mientras que en las pacientes sin enfermedad ambas sufren variaciones cíclicas en sus concentraciones. La expresión de estas dos enzimas antioxidantes de forma constante sería el resultado de una excesiva producción de ROS en la endometriosis [42].

Szczepanska et al (2003) en sus estudios del estrés oxidativo en pacientes con endometriosis, encuentra una disminución significativa de GP en el líquido peritoneal, así como un aumento de las concentraciones de lípidos peroxidados en pacientes con endometriosis cuando se comparan con pacientes control y pacientes con esterilidad idiopática, sugiriendo que los ROS juegan un papel en el desarrollo de la enfermedad [45].

En esta misma línea encontramos los trabajos de Liu et al (2001) y Portz et al (1991), que demuestran que las concentraciones de SOD en las mujeres con endometriosis y esterilidad fueron menores que en las pacientes fértiles control, lo que sugiere que los ROS están implicados en la patogénesis de la esterilidad asociada a la endometriosis.

ENDOMETRIOSIS Y FECUNDACIÓN

Parece claro que un aumento en las concentraciones de ROS en el líquido tubárico podría tener efectos perniciosos sobre la viabilidad del ovocito y los espermatozoides, así como en el proceso de la fecundación y en el transporte del embrión a través de la trompa. Además, la presencia de neutrófilos y macrófagos activados, así como de factores proinflamatorios presentes en el líquido tubárico, podría amplificar la producción de ROS en los focos de endometriosis [24].

Este aumento en la producción de ROS podría resultar en un daño oxidativo en las membranas plasmáticas y del acrosoma del espermatozoide, perdiendo éste movilidad y capacidad para unirse y penetrar en el ovocito, e inducir a su vez daño en el ADN, afectando así a la capacidad de fecundación, a la calidad embrionaria y a la tasa de gestación.

Otro elemento a favor de la hipótesis de que el aumento en la concentración de ROS y otros factores proinflamatorios en el fluido tubárico tiene un efecto deletéreo sobre el proceso de fecundación es el resultado del efecto de la histerosalpingografía (HSG) en las tasas de embarazo en las mujeres con endometriosis, como describe la hipótesis de Jonson et al (2004). La inyección de contraste a través de las trompas arrastraría todos estos factores tóxicos, además de repermeabilizar una posible obstrucción tubárica, lo que podría mejorar las tasas de gestación en las mujeres con endometriosis tras la HSG.

Estudios más recientes centran su atención en el efecto de los ROS y las citoquinas proinflamatorias sobre el ovocito durante las TRA. Así, Won-Jun et al (2007) [46], estudiaron el daño producido sobre el ovocito cuando se exponía a concentraciones crecientes de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y al factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), (citoquina proinflamatoria que está más elevada en pacientes con endometriosis) en los medios de cultivo, donde el ovocito ha perdido parte de sus mecanismos de defensa in vivo frente a la acción de estos factores.

La combinación del efecto de los ROS y TNF- α podría alterar la calidad del ovocito, y en consecuencia ser responsable de las peores tasas de fecundación, tanto *in vivo* como *in vitro*, en estas pacientes.

Tanto la exposición a H₂O₂ como TNF- α produce daño en la estructura de los microtúbulos y alineamiento de los cromosomas del óvulo, que es dosis y tiempo dependiente. Además, el daño producido es mayor cuando ambos productos se combinan.

El TNF- α también se ha visto que tiene un efecto pernicioso sobre los espermatozoides, produciendo una disminución de su movilidad. *In vitro* se ha demostrado que a las concentraciones en que el TNF- α se encuentra en el líquido peritoneal de las pacientes con endometriosis, es capaz de alterar la movilidad de los espermatozoides, y esto podría ser uno de los mecanismos causantes de infertilidad en las pacientes con endometriosis mínima-leve.

De igual modo, se ha demostrado en estudios *in vitro* que la movilidad de los espermatozoides e integridad de las membranas fue más alta en las muestras incubadas con Infliximab (anticuerpo monoclonal que neutraliza los efectos tóxicos del TNF- α) que en las muestras tratadas sólo con TNF- α . Esto sugiere que el Infliximab podría ser usado potencialmente para el tratamiento de la infertilidad femenina causada por endometriosis en aquellas pacientes con niveles elevados de TNF- α en el líquido peritoneal.

La exposición del ovocito a niveles elevados de citoquinas y ROS en pacientes con endometriosis puede ocurrir durante su paso por la cavidad peritoneal antes de ser recogido por las fimbrias, durante su paso por las trompas (que están bañadas por el líquido peritoneal y que, como hemos comentado, en pacientes con endometriosis tiene niveles altos de citoquinas proinflamatorias y ROS) o durante su cultivo en las técnicas de reproducción asistida. Esto último ha llevado a probar la adición de antioxidantes, como la vitamina C, a los medios de cultivo, y se ha visto que la

incubación de los ovocitos simultáneamente con H_2O_2 y 200 μ mol de vitamina C reduce el daño oxidativo.

Por tanto, los ROS parecen estar implicados en distintas facetas de la enfermedad: en la formación de adherencias peritoneales y en la esterilidad asociada a la endometriosis, actuando a diferentes niveles, como la capacidad de fecundación, la calidad embrionaria, la implantación y el desarrollo embrionario. Sin embargo, los resultados son aún muy dispares y están aún lejos de ser concluyentes, por lo que son necesarios más estudios al respecto [40, 44, 47, 48].

OBJETIVOS

OBJETIVOS/HIPÓTESIS DE TRABAJO

La endometriosis es una de las enfermedades más frecuentes del sistema reproductor femenino. Se caracteriza fundamentalmente por dolor y esterilidad. Con frecuencia, en estas pacientes hay que recurrir a técnicas de reproducción asistida para conseguir un embarazo.

En la endometriosis moderada-severa no hay duda de que los factores mecánicos ejercen un efecto negativo sobre la fertilidad. Más discutido es la relación de la endometriosis mínima-leve con la infertilidad. Se han postulado diversos mecanismos por los que la endometriosis mínima-leve puede afectar a la fertilidad, y ninguno es capaz de explicar por sí sólo esta asociación.

Diversos estudios han centrado su interés en el estrés oxidativo y su relación con la endometriosis. Los ROS pueden proceder de un aumento en su producción o una menor eliminación, por disminución de los sistemas antioxidantes encargados de ello. Un exceso de ROS ejerce un efecto citotóxico, con peroxidación lipídica y daño del ADN, induciendo la muerte celular.

En base a los conocimientos previos, parece crucial la capacidad antioxidante del líquido folicular, ya que su defecto podría incrementar los ROS, aumentando el daño ovocitario y por consiguiente, pudiendo afectar a la fertilidad. **En la endometriosis parece estar disminuida esta capacidad antioxidante del líquido folicular**, lo cual podría explicar en parte la infertilidad en los grados menos severos de la enfermedad, donde los factores mecánicos no juegan aún un papel relevante.

Por todo ello, los **objetivos** de este trabajo son:

- a) investigar el **estrés oxidativo** en el **líquido folicular** y **plasma** en pacientes infértiles con endometriosis en sus diversos estadios comparándolo con pacientes sin

endometriosis, cuya causa de esterilidad era factor tubárico, esterilidad de origen desconocido (EOD), factor masculino o pacientes donantes de ovocitos.

b) estudiar su **relación** con los **resultados** de las **técnicas de FIV/ICSI**.

Para el estudio del estrés oxidativo hemos seleccionado distintos marcadores. Como **antioxidantes** hemos seleccionado marcadores no enzimáticos (la *vitamina C* y la *vitamina E*), y marcadores enzimáticos (la *superóxido dismutasa*). Como marcador de **estrés oxidativo** hemos usado los lípidos peroxidados (*MDA*).

Se analizará la **relación entre los niveles de ROS y antioxidantes en LF y en plasma con los resultados en la FIV** en ambos grupos, pacientes control y pacientes con endometriosis.

Nuestra **hipótesis** consiste en saber si en el LF de las pacientes con endometriosis existen mayores niveles de ROS y/o una menor capacidad antioxidante que en las pacientes sin enfermedad, y si esto se relaciona con peores resultados en las técnicas de FIV. Intentaremos encontrar una relación entre los niveles de ROS y capacidad antioxidante del LF y plasma.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES Y MÉTODOS

1. POBLACIÓN DE ESTUDIO. SUJETOS

Se incluyeron en el estudio un total de 93 pacientes que estaban siendo estudiadas y tratadas por esterilidad en las consultas del Hospital Universitario La Paz (HULP) y en el Instituto Valenciano de Infertilidad (IVI) de Madrid, así como mujeres sanas donantes voluntarias de ovocitos en el IVI.

De las 93 pacientes, 23 se seleccionaron como casos y 70 como controles, distribuidas en los siguientes grupos, según la causa de esterilidad: factor tubárico (4); factor masculino (13); esterilidad de origen desconocido (34); esterilidad de causa mixta (factor masculino y factor tubárico) (3) y pacientes donantes (14). Dos pacientes se desecharon por falta de datos en la historia.

CRITERIOS DE INCLUSIÓN

Las pacientes estériles incluidas debían llevar al menos 1 año de esterilidad y debían ser sometidas a técnicas de FIV/ICSI, para poder obtener una muestra de líquido folicular.

A todas ellas se les explicó el procedimiento y se obtuvo su consentimiento informado de forma verbal y escrita.

De las 93 pacientes al inicio del estudio, dos de los casos fueron desechados por datos insuficientes en la historia clínica.

Las donantes de ovocitos eran mujeres sanas que, de forma voluntaria se sometieron a técnicas de estimulación y punción folicular en el IVI para la donación de ovocitos.

PERIODO DE ESTUDIO

Las pacientes se incluyeron en el estudio desde octubre de 2006 hasta junio de 2007.

Los ciclos previos y posteriores se descartaron para valorar los resultados, aunque quedaron reflejados en la historia.

RECOGIDA DE DATOS

Los datos se recogieron de la historia clínica de la paciente (edad, años de esterilidad, gestaciones previas, hábitos tóxicos, procedimientos quirúrgicos, protocolos de tratamiento seguidos, nº de ciclos, nº de sacos por ecografía, nº de gestaciones múltiples, nº de abortos y nº de embarazos ectópicos), y de la base de datos del Departamento de Biología encargado del procedimiento de FIV (nº de ovocitos recuperados, nº de ovocitos maduros y nº de ovocitos fecundados, calidad embrionaria, definida como embriones de buena calidad aquellos de 4 células y < 15% de fragmentación en el día +2 y embriones de 7-8 células y < 15% de fragmentación en el día +3, nº de embriones obtenidos, nº de transferidos y nº de congelados).

Los datos se almacenaron en una base de datos utilizando el programa informático Excel.

2. DISEÑO DEL ESTUDIO

Se trata de un estudio clínico prospectivo de cohortes dividido en tres fases:

- Fase 1: búsqueda bibliográfica del tema y elaboración de objetivos.
- Fase 2: captación de pacientes, obtención y análisis de las muestras y valoración de resultados.
- Fase 3: introducción de los datos en el programa estadístico para su estudio.

3. MÉTODOS

MÉTODO CLÍNICO

- El proceso que se siguió para la captación de los casos fue una selección de pacientes que iban a someterse a punción folicular durante un programa de FIV, tanto en el Hospital Universitario La Paz como en el IVI, desde octubre de 2006 hasta junio de 2007, en días escogidos al azar.

Del mismo modo, se seleccionaron pacientes donantes de ovocitos en el IVI.

- De cada paciente se obtuvieron dos muestras de líquido folicular y una muestra de sangre, el mismo día de la punción folicular, y se procedió con ellas como se expone mas adelante.
- Se revisó la historia clínica de cada paciente para obtener los datos citados anteriormente.
- TRATAMIENTOS EMPLEADOS PARA LA ESTIMULACIÓN OVÁRICA

Para la estimulación ovárica se emplearon tres protocolos de tratamiento:

a) Protocolo largo con agonistas

Se comenzaba el día 20-22 del ciclo anterior con la administración de 1 ampolla de Decapeptyl diario® (1 mg/día). La dosis se disminuía a la mitad (0.5 mg) en el momento de la menstruación hasta el día de la consulta, donde se verificaba el reposo ovárico, mediante ecografía (descartando la presencia de folículos > 10mm de diámetro) y estradiol sérico (< 50 pg/ml). Una vez confirmado el reposo ovárico se iniciaba la estimulación con gonadotropinas, manteniendo el análogo hasta el día de la punción folicular. En función de las características de cada paciente, las dosis diarias de gonadotropinas oscilaban entre 150-300 UI de FSH con o sin actividad LH. En general se comenzaba la estimulación el tercer día del ciclo, y el primer control se realizaba alrededor del sexto día de tratamiento, con ecografía y estradiol sérico.

La punción se programaba cuando había > de 3 folículos de 18 mm de diámetro y < 15 folículos, con la administración de 5000-10000 UI de Gonadotropina Coriónica Humana (hCG Lepori®) o 250 µg de Coriogonadotropina alfa (Ovitrelle®), y se realizaba la punción folicular a las 36 horas. Desde la misma noche de la punción se iniciaba el tratamiento con Progesterona micronizada 400 mg/día durante 14 días, que se citaba en consulta.

b) Protocolo corto con agonistas

La administración del agonista comenzaba el 2º día del ciclo (para aprovechar el efecto *flare up*) con media ampolla de Decapeptyl diario®. Las gonadotropinas empezaban también a administrarse el 2º-3º día del ciclo. El primer control se realizaba el 6º-7º día, con ecografía y estradiol sérico, y en función de los hallazgos se mantenía el tratamiento hasta que los folículos alcanzaban un tamaño de 18-20 mm, en que se administraba la hCG u Ovitrelle® y 36 horas después se programaba la punción folicular. Del mismo modo, desde el día de la punción se comenzaba la administración de 400 mg diarios de Progesterona micronizada.

c) Protocolo con antagonistas

La estimulación con gonadotropinas comenzaba el 2º-3º día del ciclo, con dosis diarias de 150-300 UI de FSH con o sin actividad LH, durante 5-6 días. El primer control se realizaba el 5º ó 6º día con ecografía y estradiol sérico. Si se observaban folículos de 13-14 mm, simultáneamente a la administración de gonadotropinas se iniciaba el tratamiento con antagonistas, bien dosis de 0.25 mg/día hasta el día de la administración de la hCG incluido, o dosis única de 3 mg. Cuando el tamaño de los folículos había alcanzado los 18 mm de diámetro, se administraba la hCG u Ovitrelle®, y la punción se realizaba a las 36

horas. La Progesterona se administraba desde el día de la punción folicular.

MÉTODO DIAGNÓSTICO

- Las pacientes incluidas en el estudio se consideraron casos si tenían el diagnóstico de endometriosis. El diagnóstico de endometriosis se realizó tanto ecográficamente como anatomopatológicamente, si la paciente había sido sometida previamente a una intervención quirúrgica por endometriosis.

Aunque la laparoscopia sigue siendo el “*gold standard*” para el diagnóstico definitivo de endometriosis, la ecografía transvaginal, y más asociada a doppler color, ofrece un diagnóstico muy preciso de los endometriomas ováricos y los focos de endometriosis vesicales. Las características ecográficas más frecuentes del endometrioma es el de una formación quística, unilocular, de límites precisos y contenido sonoluscente, con ecos de baja densidad distribuidos de forma homogénea, sin tabiques ni papilas. Ausencia o muy escaso mapa color con doppler, en su interior. Si bien, podemos encontrar en ocasiones imágenes menos típicas, con áreas hiperecogénicas alternando con áreas sonoluscentes o zonas hiperecogénicas en su interior, a modo de papilas o niveles. O incluso imágenes quísticas de contenido completamente sonoluscente, difíciles de diferenciar de formaciones funcionales.

El diagnóstico de la adenomiosis por ecografía no es tan fácil. Podemos distinguir dos tipos diferentes de imágenes ecográficas de adenomiosis:

- La imagen difusa, con estriaciones hipoecogénicas desde el endometrio hasta el miometrio, y pérdida del límite entre endometrio y miometrio.
- La forma nodular, que se puede identificar con más claridad, y muestra nodularidades hipoecoicas en el espesor del miometrio. Con doppler color se observa una ausencia de vascularización en su interior, lo que ayuda a diferenciar de posibles vasos o dilataciones varicosas uterinas.

También los leiomiomas, con un anillo vascular bien definido alrededor son fácilmente diferenciables de la adenomiosis, donde los vasos son perpendiculares a la pared del miometrio[49].

- Los controles eran pacientes con diagnóstico de esterilidad de causa distinta a la endometriosis. Los métodos diagnósticos para los distintos tipos de esterilidad fueron los seguidos por los protocolos habituales de diagnóstico.

Así, la muestra quedó definida en:

- Casos: 23
- Controles: 68
 - Donantes: 14
 - Esterilidad de origen desconocido (EOD): 34
 - Esterilidad mixta: 3
 - Factor tubárico: 4
 - Factor masculino: 13

MÉTODO BIOQUÍMICO

- Las muestras de líquido folicular sanguinolentas se desecharon. Las muestras seleccionadas se dividieron en dos alícuotas, una para análisis y la otra se reservó para una posible utilización a lo largo del estudio. Se centrifugaron a 2900 rpm durante 10 minutos para separar el sobrenadante del precipitado (que contendrá detritus y células de la granulosa), y se congelaron a un mínimo de -30° C hasta su análisis en el Departamento de Bioquímica, sección de Gastroenterología del Hospital La Paz.

De igual modo se procedió con las muestras de sangre, para separar el plasma de las células. El plasma se congeló a -30°C junto a las muestras de líquido folicular y el resto se desechó.

- Como antioxidantes se midieron, tanto en plasma como en líquido folicular, las vitaminas C y E, y la actividad del enzima SOD. Como parámetro para medir los ROS se analizó la oxidación de lípidos (lipoperóxidos o MDA).
- Las técnicas usadas para la medición fueron las que se describen a continuación:

➤ **Vitamina E**

El método utilizado para la cuantificación de vitamina E fue la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

La HPLC es una técnica utilizada para separar los componentes de una mezcla basándonos en diferentes tipos de interacciones químicas entre sustancias analizadas y la columna cromatográfica. En la HPLC el compuesto pasa por la columna cromatográfica a través de la *fase estacionaria* (normalmente, un cilindro con pequeñas partículas redondeadas con ciertas características químicas en su superficie) mediante el bombeo de líquido (*fase móvil*) a alta presión a través de la columna. La muestra a analizar es introducida en pequeñas cantidades, y sus componentes se retrasan diferencialmente dependiendo de las interacciones químicas o físicas con la fase estacionaria a medida que avanzan por la columna. El grado de retención de los componentes de la muestra depende de la naturaleza del compuesto, de la composición de la fase estacionaria y de la fase móvil. El tiempo que tarda un compuesto a ser eluido de la columna se denomina *tiempo de retención* y se considera una propiedad identificativa característica de un compuesto en una determinada fase móvil y estacionaria. La utilización de presión en este tipo de cromatografías incrementa la velocidad lineal de los compuestos dentro de la columna y reduce así su difusión dentro de la columna mejorando la resolución de la cromatografía.

El rango de normalidad establecido en nuestro laboratorio para la vitamina E en suero en adultos es de 8,00-21,00 ug/mL. Sin embargo no existen valores establecidos de vitamina E en líquido folicular. La técnica presenta un límite de detección (sensibilidad) de 0,8 ug/mL y una especificidad del 97,3 % (CV intraensayo de 2,58 y CV interensayo de 2,64).

➤ **Vitamina C**

El método utilizado para la cuantificación de vitamina C fue la espectrofotometría.

La espectrofotometría es un método de análisis *cuantitativo*, en el que la cantidad de una sustancia es estimada comparando la intensidad de color producida por ella con un reactivo específico, con la intensidad de color producida por una cantidad estándar de la sustancia. La absorción de radiación por una muestra en la región visible (colorimetría), así como en general en cualquier región del espectro, está regida por la ley de Lambert-Beer. Esta ley establece que la fracción de luz absorbida por una muestra es tanto mayor cuanto más grande es el número de moléculas sobre las que incide la radiación.

El rango de normalidad establecido en nuestro laboratorio para la vitamina C en suero en adultos es de 6,00-20,00 ng/mL. Sin embargo no existen valores establecidos de vitamina C en líquido folicular. La técnica presenta un límite de detección (sensibilidad) de 0,39 ng/mL, con una especificidad cercana al 98% (CV intraensayo de 2.33 y CV interensayo de 2.51).

➤ **Lipoperóxidos**

El método utilizado para la cuantificación de lipoperóxidos fue también la espectrofotometría. El rango de normalidad establecido en nuestro laboratorio para los lipoperóxidos en suero es de 0,10-16,00 nmol/mL. Sin embargo no

existen valores establecidos en líquido folicular. La técnica presenta el límite de detección en 0,1 nmol/mL y una especificidad mayor del 95%.

➤ **Superóxido dismutasa**

El método utilizado para la cuantificación de la SOD fue el ELISA.

La técnica ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay) es utilizada para la detección de muy diversas moléculas biológicas basándose en la especificidad del reconocimiento antígeno-anticuerpo y en la sensibilidad de las pruebas enzimáticas. Permite detectar una proteína a través de su precipitación por sus correspondientes anticuerpos. Existen numerosas variantes de este tipo de ensayo. Entre ellos se encuentran los métodos directo e indirecto. El *método directo* permite la detección del antígeno con un anticuerpo específico conjugado con una enzima como sistema de marcaje. En el *método indirecto* el antígeno reacciona con el anticuerpo específico. El complejo antígeno-anticuerpo es entonces detectado por un segundo anticuerpo que reconoce dominios constantes de anticuerpos. Este anticuerpo, que suele ser específico de especie, es el que está marcado enzimáticamente. Esto permite que un mismo anticuerpo marcado sea capaz de detectar diferentes antígenos. En ambos métodos, la reacción enzimática puede ser detectada espectrofotográficamente con un lector ELISA.

Las 4 fases de un ensayo ELISA son las siguientes:

1. Conjugación del anticuerpo o del antígeno con un enzima (peroxidasa, fosfatasa alcalina...). El anticuerpo conjugado al enzima se emplea en los ensayos directos e indirectos, sándwich etc...El antígeno marcado se emplea en ensayos de competición de antígeno.

A. Marcaje del anticuerpo

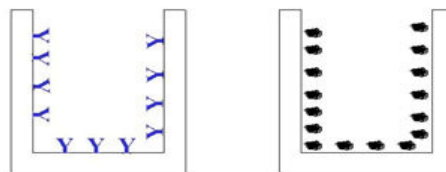


A'. Marcaje del antígeno



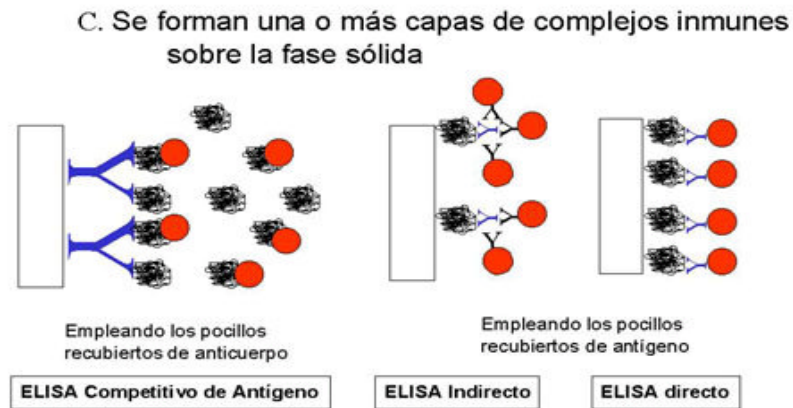
2. Unión del antígeno (o del anticuerpo) a los pocillos. La unión de anticuerpos o antígenos se realiza con facilidad a la superficie de plásticos tratados que tienen gran afinidad por proteínas.

B. Unión del anticuerpo o del antígeno a la fase sólida

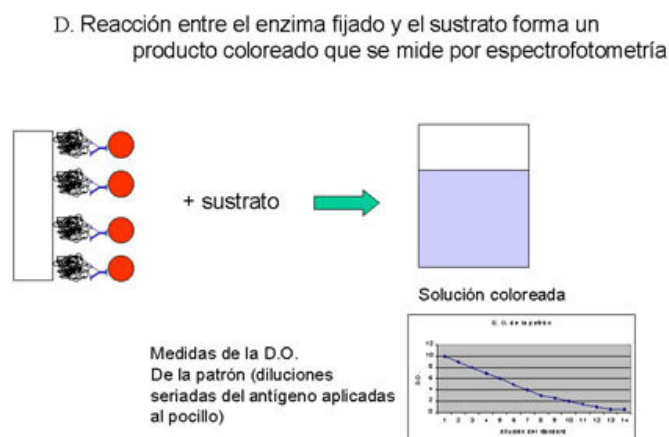


3. Formación de una o más capas de inmunocomplejos. En el caso de antígeno unido a la placa se puede detectar mediante un anticuerpo primario anti-antígeno marcado (ELISA directo) o empleando un anticuerpo primario anti-antígeno y uno secundario anti-primario marcado (ELISA indirecto). Este segundo método permite la amplificación de la señal al poderse unir uno o más anticuerpos secundarios a cada anticuerpo primario. En el caso del anticuerpo unido a la placa se incuba con una muestra de antígeno y antígeno marcado.

Se ensayan diferentes relaciones de antígeno frío frente a una cantidad fija de antígeno marcado. Es el ensayo de competición del antígeno.



4. Revelado de la reacción enzimática. Después de un lavado para eliminar todas las moléculas marcadas no fijadas en forma de inmunocomplejos se añade el sustrato enzimático en solución. Se deja reaccionar y se lee la densidad óptica mediante espectrofotometría.



No existen rangos de normalidad establecidos para la concentración de SOD ni en suero ni en líquido folicular. El límite de detección de la técnica (sensibilidad) es de 0.04 ng/mL y la especificidad es cercana al 100% ya que no hay descritas reacciones cruzadas. La precisión intraensayo es del 5.1% e interensayo del 5.8%.

MÉTODO ESTADÍSTICO

Para estudiar la relación entre las variables cualitativas empleamos las pruebas estadísticas del Chi cuadrado y Test exacto de Fisher, cuando no se cumplían las condiciones de aplicabilidad de la primera.

Para comparar la distribución en dos grupos de las variables cuantitativas, dado que nuestra muestra era pequeña y no cumplía las condiciones de una distribución normal, empleamos la prueba no paramétrica U de Mann Whitney.

Para evaluar el cambio en dos tiempos de una misma variable cuantitativa empleamos otro test no paramétrico pareado, el Test de Wilcoxon, por el mismo motivo que he comentado anteriormente.

Para el estudio de la asociación entre dos variables cuantitativas utilizamos el coeficiente de correlación de Spearman, test no paramétrico que se emplea para muestras pequeñas y cuando no hay normalidad.

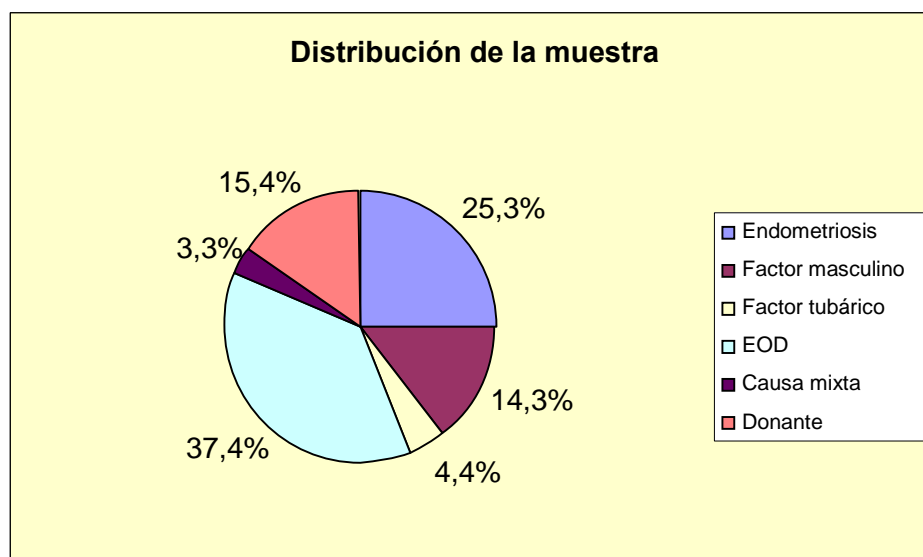
RESULTADOS

RESULTADOS

1. CARACTERÍSTICAS DE LA MUESTRA

Al final del estudio participaron un total de 91 pacientes, distribuidas en los siguientes grupos, según la causa de esterilidad.

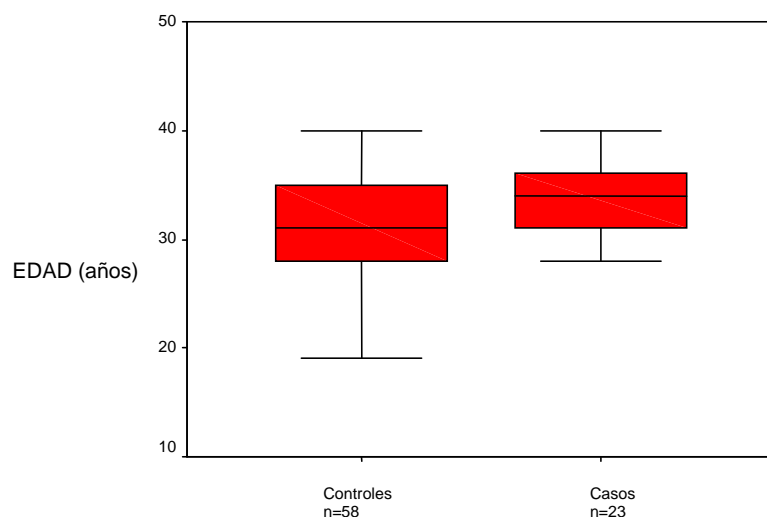
	Nº	%
Endometriosis (casos)	23	25.3
Factor masculino	13	14.3
Factor tubárico	4	4.4
Esterilidad de origen desconocido (EOD)	34	37.4
Causa mixta	3	3.3
Donantes	14	15.4
Total.....	91	100



Se recogieron de la historia clínica de la paciente, tanto en papel como informatizada, una serie de datos clínicos importantes que pueden influir en el resultado de las técnicas de FIV, y que actúan como variables independientes a las variables que queremos medir, tanto en líquido folicular como en suero.

1a. Edad de las pacientes

La edad media de las pacientes fue de 31.6 años (DS 4.9); siendo en los casos de 33.6 (DS 3.2) y de 30.8 (DS 5.2) años en los controles, sin diferencias estadísticamente significativas ($p>0.05$).



1b. Edad del varón

La edad media del varón fue de 37.6 años (DS 4.5); siendo de 36.1 (DS 4) entre los casos y de 38.3 años (DS 4.6) entre los controles, sin diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos ($p>0.05$).

1c. Años de esterilidad

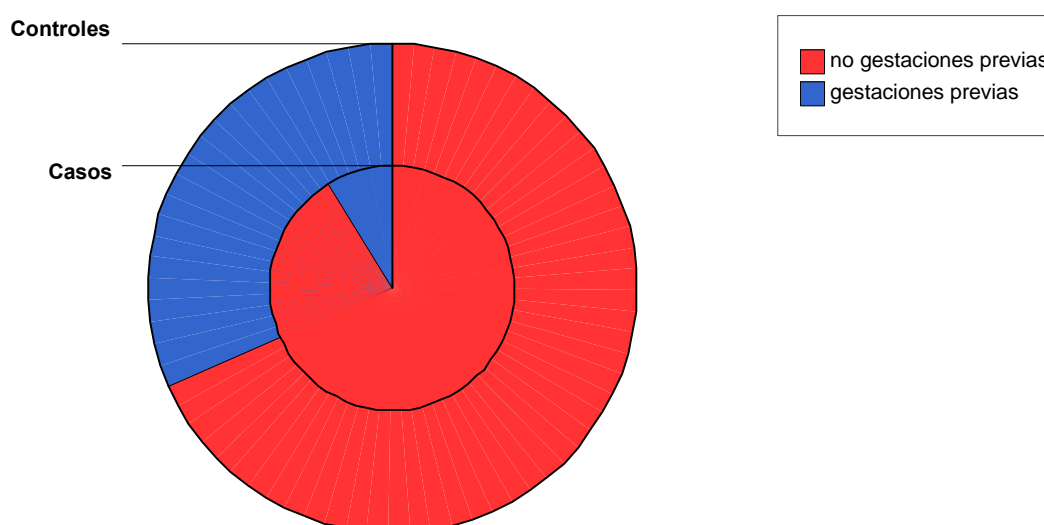
La media de años de esterilidad en la muestra fue de 3.19 (DS 1.65); entre los casos fue de 2.95 (DS 1.3) y entre los controles 3.37 años (DS 1.8), sin diferencias significativas entre los grupos ($p>0.05$).

1d. Gestaciones previas

Del conjunto de pacientes que configuraban el grupo control, 18 pacientes habían tenido al menos una gestación previa, lo que supone un 31.6% de entre los controles. De entre ellas, hubo 1 caso de mola completa y 5 pacientes con abortos, dos de ellas de repetición (2 y 3 abortos respectivamente).

De los 23 casos, sólo 2 habían tenido gestación previa (8.7%) y ninguna de las dos había llegado a término (1 embarazo ectópico y 1 aborto).

Las diferencias entre ambos grupos fueron estadísticamente significativas (31.6% vs 8.7%; $p=0.045$).



1e. Hábito tabáquico

Otro dato que se recogió de la historia clínica fue el hábito tabáquico de las pacientes, pues se sabe que el tabaco aumenta el estrés oxidativo a nivel celular. Existe una relación directa entre el número de cigarrillos y estrés oxidativo, por eso dividimos la muestra de pacientes en aquellas que fumaban más de 10 cigarrillos al día y menos de 10 cigarrillos al día. Sin embargo, sólo una paciente del grupo de las fumadoras consumía menos de 10 cigarrillos al día, por lo que al final consideramos sólo dos grupos de pacientes: pacientes fumadoras y no fumadoras.

En el grupo control, el 71.9% de las pacientes eran no fumadoras y el 28.1% fumadoras. Entre los casos, el 81.8% eran no fumadoras y el 18.2% fumadoras. No hubo diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos ($p>0.05$).

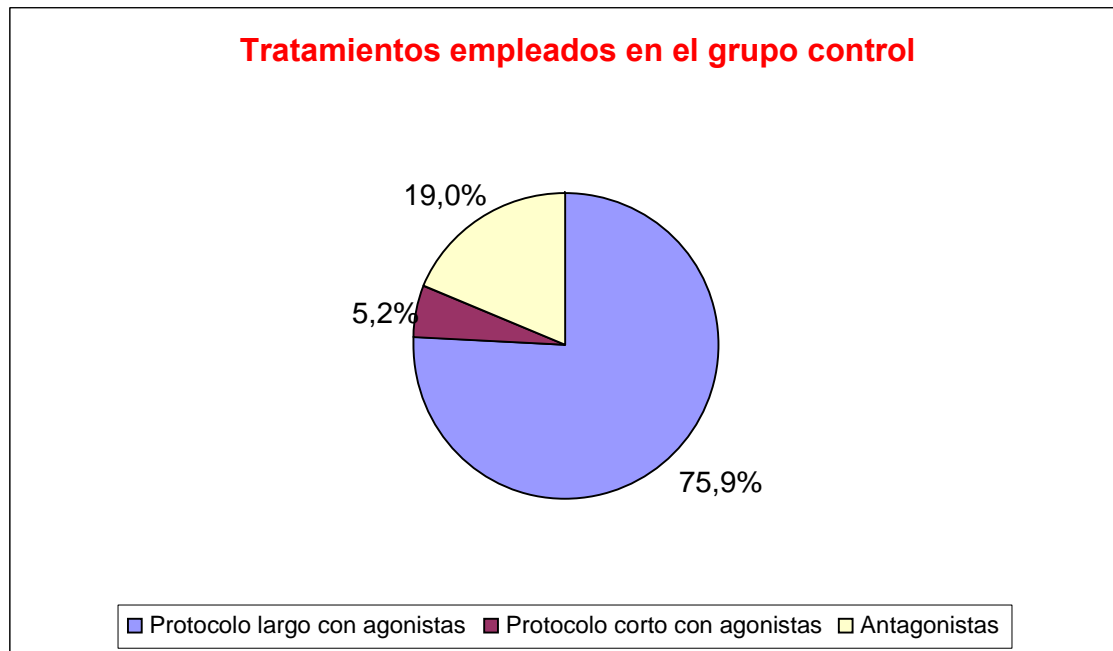
2. TRATAMIENTOS EMPLEADOS EN LA ESTIMULACIÓN OVÁRICA

Para la estimulación ovárica se emplearon las gonadotropinas, en tres protocolos de tratamiento; protocolo largo con agonistas, protocolo corto con agonistas y protocolo con antagonistas de la GnRH.

La dosis media total de FSH utilizada durante los tratamientos fue de 1857.5 UI (DS 456.9) en el grupo control y de 1957.4 UI (DS 492.5) entre los casos, sin diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos ($p>0.05$).

Para la supresión hipofisiaria se emplearon los análogos de la GnRH. En nuestro grupo de estudio se emplearon los protocolos largo y corto con agonistas y el protocolo con antagonistas, según la siguiente distribución.

En el grupo control, se empleó el protocolo largo con agonistas en el 75.9% de las pacientes; corto en el 5.2% y el protocolo con antagonistas en el 19%.



Entre los casos se empleó el protocolo largo con agonistas en el 52.2% de las pacientes, en el 17.4% se empleó el protocolo corto y en el 30.4% se empleó el protocolo con antagonistas.



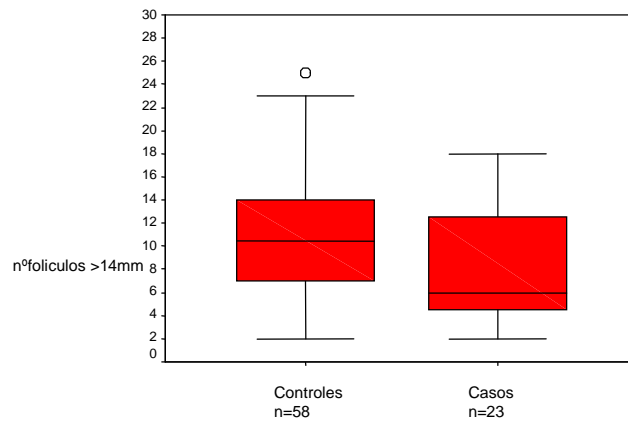
En ninguno de los protocolos utilizados se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos ($p > 0.05$).

3. RESPUESTA Y RESULTADOS DEL TRATAMIENTO

3a. Número de folículos mayores de 14 mm de diámetro

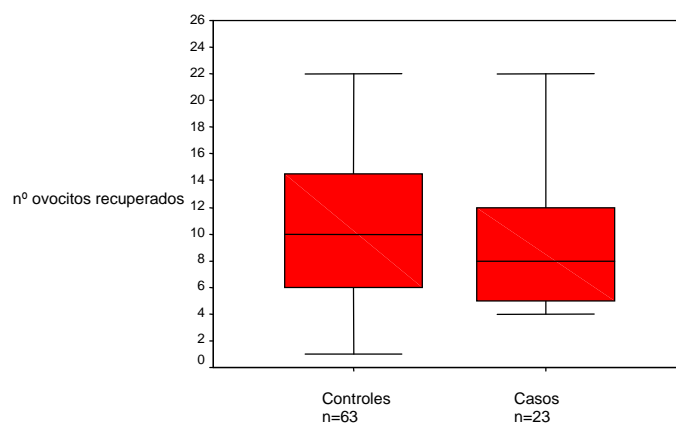
Para considerar una buena respuesta ovárica a la estimulación con gonadotropinas tuvimos únicamente en cuenta aquellos folículos mayores de 14 mm de diámetro.

En el grupo control, la mediana del número de folículos > 14 mm en ambos ovarios fue de 10.5 (rango 2-25) y entre los casos, obtuvimos una mediana de 6.0 (2-18). La diferencia entre ambos grupos fue estadísticamente significativa ($p = 0.007$).



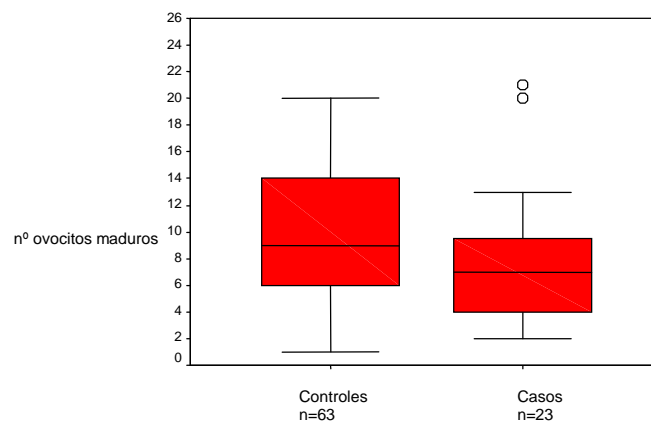
3b. Número de ovocitos recuperados

La mediana del número de ovocitos recuperados fue de 10 (1-22) en el grupo control y de 8 (4-22) en los casos, sin diferencias significativas entre los grupos ($p>0.05$).



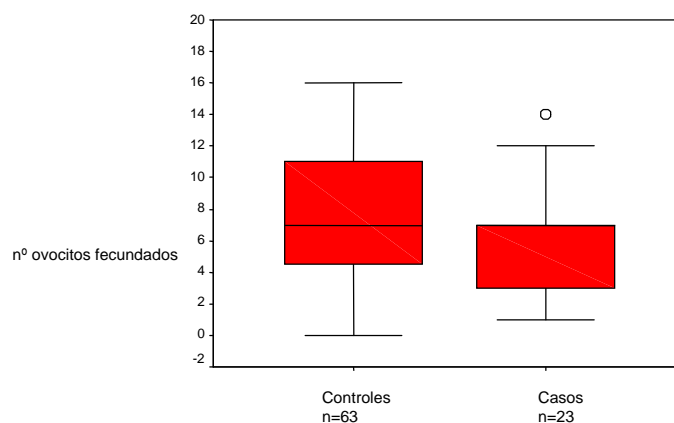
3c. Número de ovocitos maduros

La mediana del número de ovocitos maduros en el grupo control fue de 9 (1-20) y en los casos 7 (2-21), sin diferencias estadísticamente significativas ($p>0.05$).



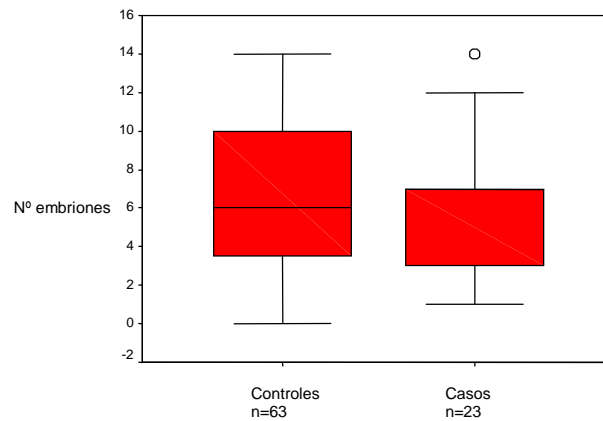
3d. Número de ovocitos fecundados

En el grupo control la mediana fue de 7 (0-16), igual a la obtenida entre los casos, 7 (1-14). No hubo diferencias entre ambos grupos ($p>0.05$).



3e. Número de embriones

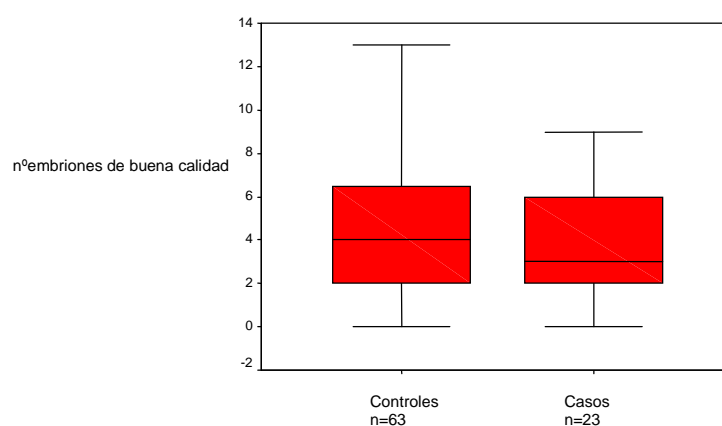
En el grupo control la mediana fue de 6 (0-14), y en los casos de 7 (1-14), sin diferencias estadísticamente significativas ($p>0.05$).



3f. Número de embriones de buena calidad

Definimos embriones de buena calidad aquellos de 4 células y < 15% de fragmentación en el día +2 y embriones de 7-8 células y < 15% de fragmentación en el día +3.

Según ello, la mediana del número de embriones de buena calidad en el grupo control fue de 4 (0-13) y en los casos de 3 (0-9). No hubo diferencias estadísticamente significativas ($p>0.05$).

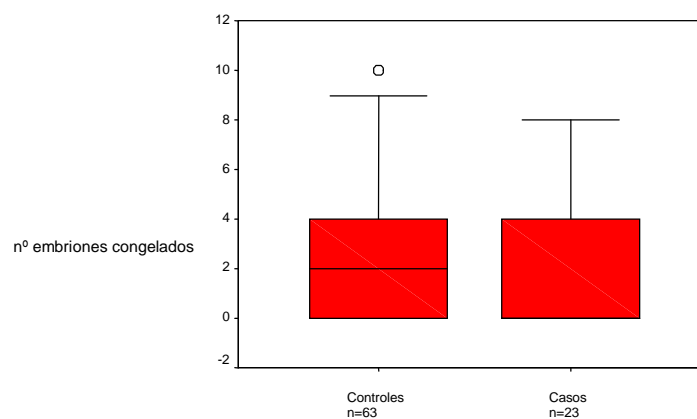
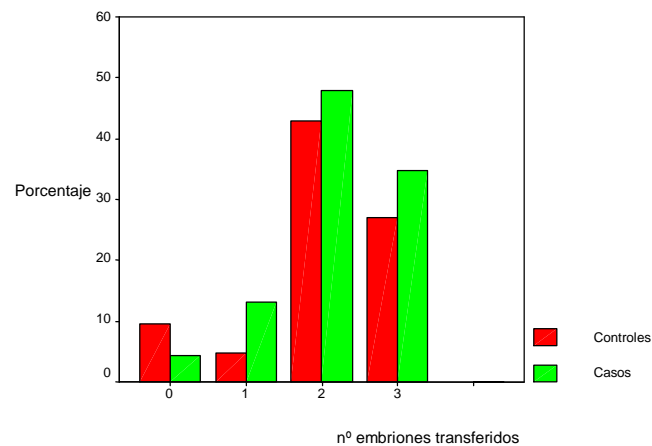


3g. Embriones transferidos y embriones congelados

Tampoco hubo diferencias significativas entre ambos grupos en el número de embriones transferidos y embriones congelados ($p>0.05$).

	Grupo control	Grupo casos
Embr. transferidos	2 (0-3)*	2 (0-3)*
Embr. congelados	2 (0-10)*	2 (0-8)*

* Los valores se dan en mediana y rango intercuartílico



3h. Tasa de gestación clínica

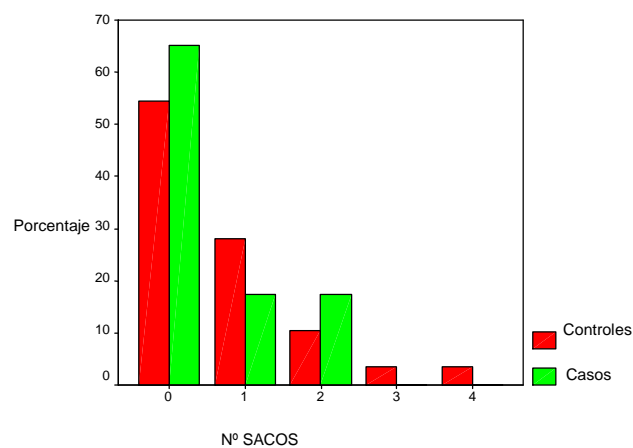
Se define como el número de sacos visualizados ecográficamente por transferencia embrionaria realizada. En el grupo control fue del 46.1% y en los casos del 34.8%. Las diferencias fueron estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

3i. Número de sacos

El porcentaje del número de sacos por ecografía en ambos grupos se muestra en la siguiente tabla:

Número de sacos	Controles (%)	Casos (%)
1	59	50
2	18.9	50
3	6.3	
4	6.3	
No datos	9.5	
Total	100	100

No hubo diferencias estadísticamente significativas al comparar ambos grupos ($p > 0.05$).



3j. Número de embarazos múltiples

En el grupo control se registró un 19.3% de gestaciones múltiples, y un 17.4% entre los casos, sin diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ($p>0.05$).

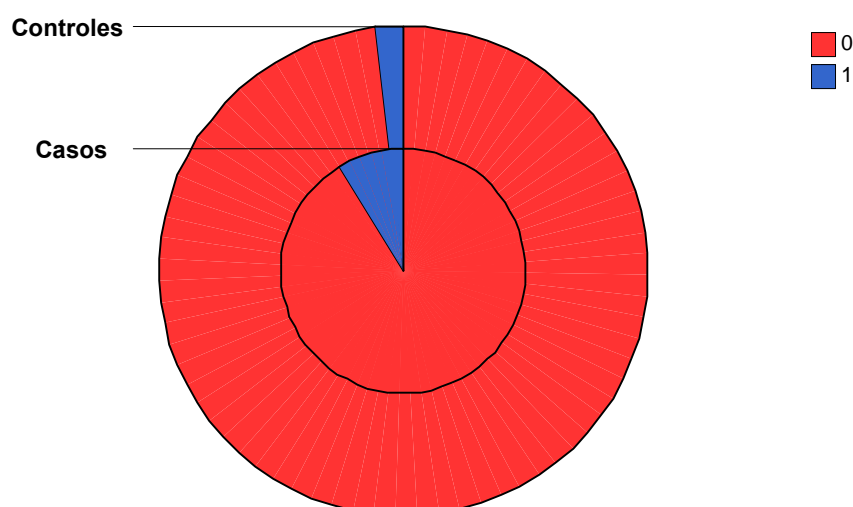
3k. Número de abortos

El porcentaje de abortos en el grupo control fue de 15.9% y entre los casos de 13%, sin encontrarse diferencias significativas entre ambos ($p>0.05$).

3l. Número de embarazos ectópicos

Se registró un porcentaje del 1.8% de embarazos ectópicos en el grupo control, mientras que entre los casos encontramos un 8.7% de gestaciones ectópicas. Tampoco se registraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ($p>0.05$), si bien se observa una tendencia de casi 4 veces más gestaciones ectópicas entre los casos.

Gestaciones ectópicas



4. ESTRÉS OXIDATIVO Y CAPACIDAD ANTIOXIDANTE EN PLASMA Y LÍQUIDO FOLICULAR

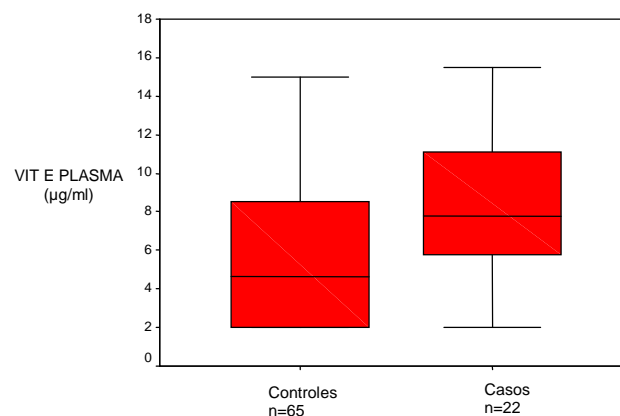
Como antioxidante se midieron, tanto en plasma como en líquido folicular, las vitaminas C y E, y la actividad del enzima SOD.

Como parámetro para medir los ROS se analizó la oxidación de lípidos (lipoperóxidos o MDA).

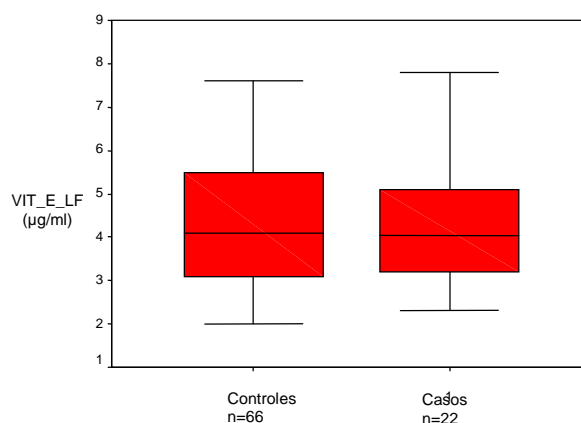
Los valores se analizaron por separado en ambos grupos, realizándose una posterior comparación entre ambos.

4a. Vitamina E

Los valores medios de vitamina E **en plasma** fueron de 5.20 µg/ml (DS 3.22) en el grupo control y de 8.13 µg/ml (DS 3.80) en los casos. Al comparar las diferencias entre ambos grupos se encontró una significación estadística para los niveles mas elevados de vitamina E en plasma entre los casos (p=0.001).



Los valores de vitamina E en el **líquido folicular** fueron en cambio muy parecidos en ambos grupos: controles, 4.30 $\mu\text{g/ml}$ (DS 1.51) y casos, 4.32 $\mu\text{g/ml}$ (DS 1.45), sin diferencias estadísticamente significativas ($p>0,05$).



	Controles	Casos	p
Plasma ($\mu\text{g/ml}$)	5.20 (DS 3.22)	8.13 (DS 3.80)	0.001
LF ($\mu\text{g/ml}$)	4.30 (DS 1.51)	4.32 (DS 1.45)	NS

Valores de vitamina E en plasma y LF

4b. Vitamina C

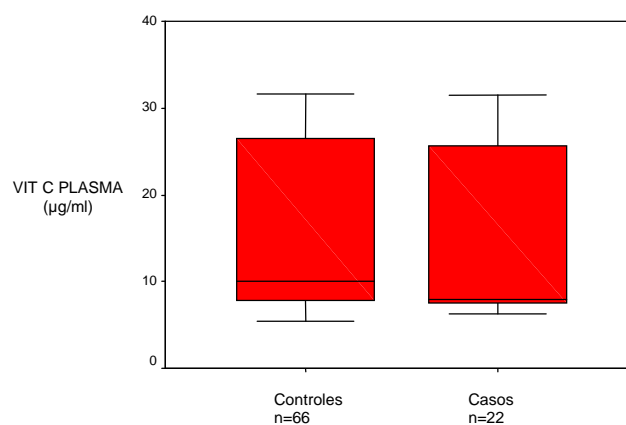
A diferencia de los valores hallados en la vitamina E, los valores de vitamina C fueron muy similares en plasma en ambos grupos, sin diferencias estadísticamente significativas.

Sin embargo, en líquido folicular, sí encontramos valores más altos de vitamina C en el grupo control respecto a los casos, con una significación estadística $p < 0.01$.

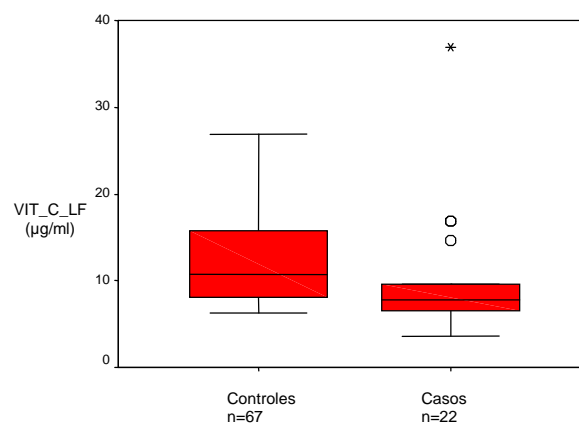
	Controles	Casos	p
Plasma ($\mu\text{g/ml}$)	15.40 (DS 9.13)	14.10 (DS 9.58)	NS
LF ($\mu\text{g/ml}$)	12.78 (DS 5.93)	9.79 (DS 6.95)	0.003

Valores de vitamina C en plasma y LF

Vitamina C en plasma



Vitamina C en LF

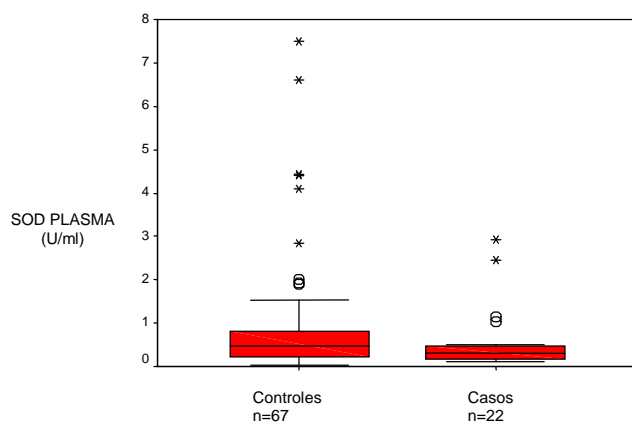


4c. Superóxido dismutasa

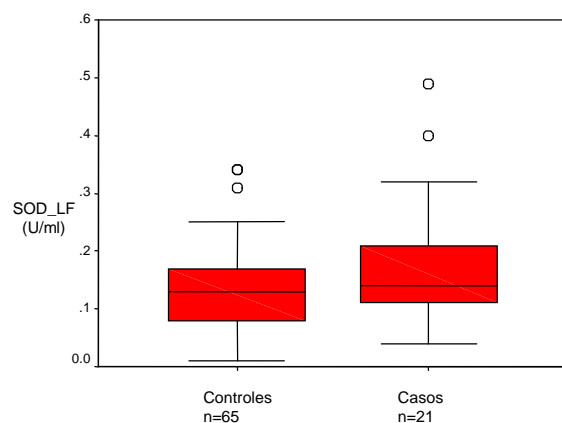
La actividad de la SOD en **plasma** difirió significativamente entre los controles y las pacientes que configuraban el grupo de los casos ($p=0.059$). La actividad fue mayor en el grupo control.

Sin embargo, no hubo diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos en la actividad de la SOD en **LF** ($p>0.05$).

SOD en plasma



SOD en LF

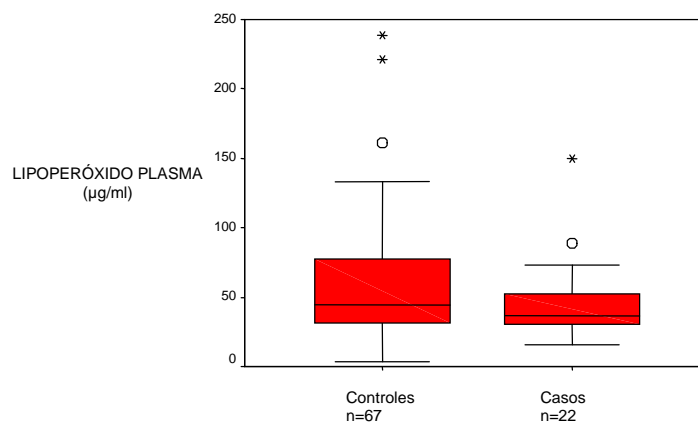


	Controles	Casos	p
Plasma (U/ml)	0.93 (DS 1.43)	0.55 (DS 0.74)	0.059
LF (U/ml)	0.13 (DS 0.07)	0.17 (DS 0.11)	NS

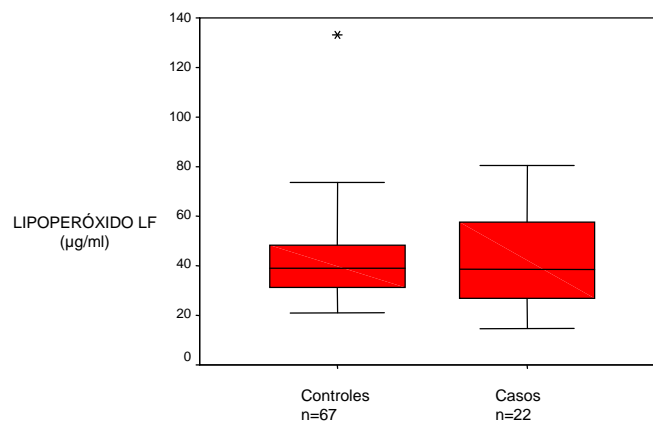
Actividad de la SOD en plasma y LF

4d. Lipoperóxidos (MDA)

Los valores de MDA en **plasma** fueron mayores en el grupo control, 57.62 µg/ml (DS 44.2), que en los casos, 46.05 µg/ml (DS 29.18), pero la diferencia no fue estadísticamente significativa ($p>0.05$).



En **LF**, los valores de los MDA fueron muy similares en ambos grupos: controles, 42.25 µg/ml (DS 16.9) y casos, 43.11 µg/ml (DS 19.99), también sin diferencias estadísticamente significativas ($p>0.05$).



	Controles	Casos	p
Plasma (µg/ml)	57.62 (DS 44.20)	46.05 (DS 29.18)	NS
LF (µg/ml)	42.25 (DS 16.9)	43.11 (DS 19.99)	NS

Lipoperóxidos en plasma y LF

5. CORRELACIÓN ENTRE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE Y ESTRÉS OXIDATIVO DE PLASMA Y LÍQUIDO FOLICULAR CON LOS RESULTADOS DE LAS TÉCNICAS DE FIV

Una vez obtenidos los valores del enzima SOD y las vitaminas E y C, como antioxidantes en plasma y LF, y de los lipoperóxidos (MDA) como parámetro para medir el estrés oxidativo en ambos medios, y analizadas las diferencias entre el grupo control y las pacientes con endometriosis, pasamos a analizar si existía alguna correlación entre ellos y los resultados de las técnicas de FIV.

Para valorar el resultado obtenido en las técnicas de FIV analizamos el número de **embriones** conseguidos, el número de **embriones de buena calidad**, la **tasa de implantación**, y el número de **ovocitos recuperados, maduros y fecundados**.

La tasa de implantación la obtuvimos en ambos grupos como el cociente entre el número de sacos partido por el número de embriones transferidos.

$$\textit{Tasa de implantación} = \textit{n}^{\circ} \textit{ sacos} / \textit{n}^{\circ} \textit{ embriones transferidos}$$

Primero analizamos si existía alguna correlación en el conjunto global de la muestra (casos y controles), para posteriormente analizar dichas correlaciones en cada grupo de estudio por separado.

5.1 Vitamina E

Con respecto a la vitamina E, no encontramos ninguna correlación con ninguno de los parámetros de valoración del resultados de las técnicas de FIV, ni en plasma ni en LF.

Estos mismos hallazgos se mantuvieron cuando analizamos los grupos por separado.

Correlación de la vitamina E con los marcadores de los resultados de las técnicas de FIV en el conjunto global de la muestra

		Nº embriones	Nº embriones de buena calidad	Tasa implantación	Nº Ovoc recuperados	Nº Ovoc maduros	Nº Ovoc fecundados
Vit E Plasma	Coeficiente correlación*	0.028	0.051	-0.040	0.036	0.093	0.049
	Significación estadística	p=0.800	p=0.647	p=0.739	p=0.744	p=0.405	p=0.660
Vit E LF	Coeficiente correlación*	0.096	0.027	0.180	-0.029	0.011	0.078
	Significación estadística	p=0.389	p=0.810	p=0.130	p=0.795	p=0.919	p=0.483

*Coeficiente de correlación de Spearman

Correlación de la vitamina E con los marcadores de los resultados de las técnicas de FIV por grupos

		Nº embriones	Nº embriones de buena calidad	Tasa implantación	Nº Ovoc recuperados	Nº Ovoc maduros	Nº Ovoc fecundados
Vit E plasma (0)	Coeficiente correlación*	0.098	0.172	0.016	0.092	0.197	0.158
	Significación estadística	p=0.451	p=0.184	p=0.912	p=0.481	p=0.128	p=0.224
Vit E plasma (1)	Coeficiente correlación*	-0.156	-0.190	-0.033	-0.144	-0.027	-0.136
	Significación estadística	p=0.488	p=0.398	p=0.889	p=0.523	p=0.906	p=0.547
Vit E LF (0)	Coeficiente correlación*	0.094	0.016	0.185	-0.035	0.014	0.068
	Significación estadística	p=0.474	p=0.901	p=0.193	p=0.790	p=0.916	p=0.606
Vit E LF (1)	Coeficiente correlación*	0.085	-0.039	0.141	-0.149	-0.127	0.053
	Significación estadística	p=0.706	p=0.865	p=0.542	p=0.508	p=0.575	p=0.816

*Coeficiente de correlación de Spearman

0= grupo control

1= casos

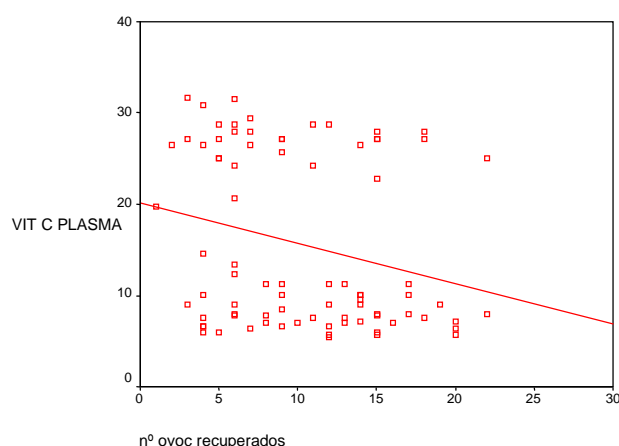
5.2 Vitamina C

Al analizar el conjunto global de la muestra encontramos una correlación estadísticamente significativa entre los valores de vitamina C en PLASMA y el número de ovocitos recuperados, maduros y fecundados ($p=0.036$, $p=0.007$ y $p=0.046$, respectivamente).

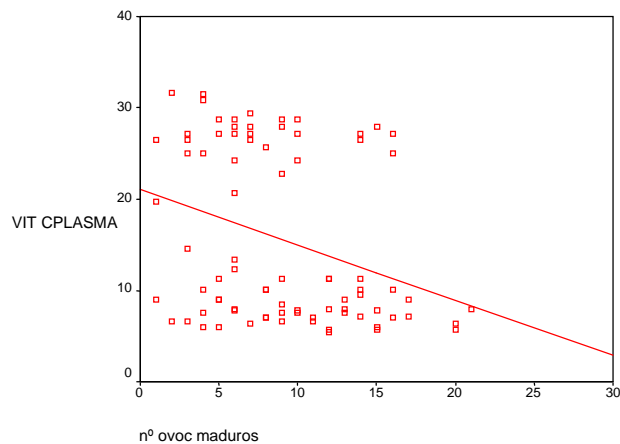
La correlación fue negativa, lo cual se puede interpretar como que los niveles de la vitamina C en plasma fueron menores a mayor número de ovocitos recuperados, ovocitos maduros y ovocitos fecundados.

Aunque no estadísticamente significativo, estuvo próximo a la significación estadística la correlación de la vitamina C en plasma con el número de embriones de buena calidad ($p=0.057$). Dicha correlación fue también negativa.

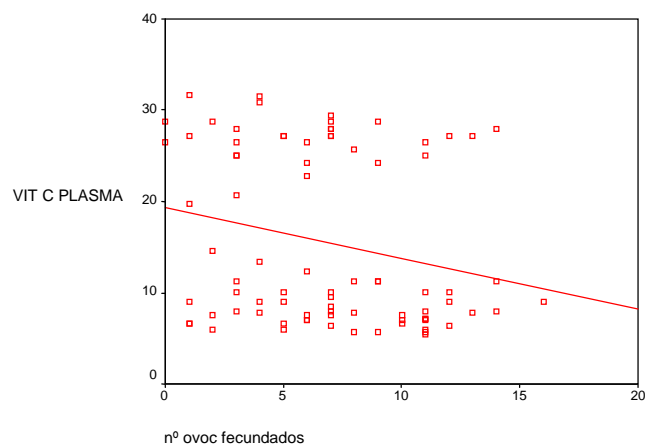
Correlación de la vitamina C en plasma con nº ovocitos recuperados, en el conjunto global de la muestra



Correlación de la vitamina C en plasma con nº ovocitos maduros, en el conjunto global de la muestra



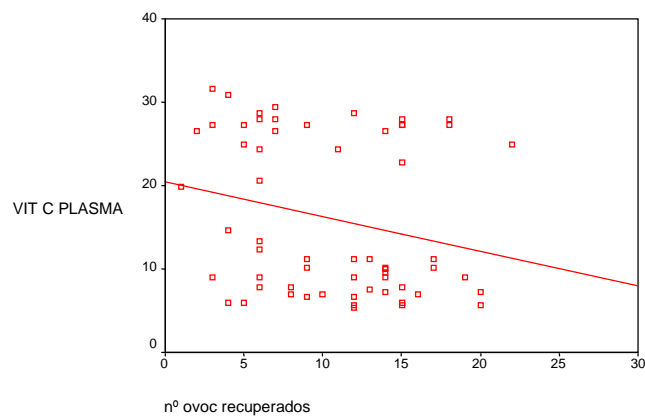
Correlación de la vitamina C en plasma con nº ovocitos fecundados, en el conjunto global de la muestra



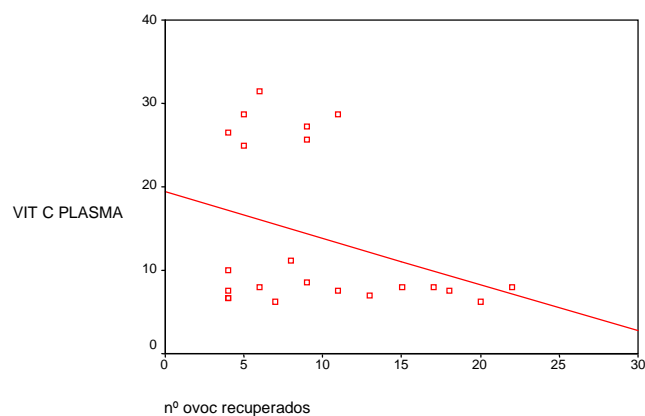
Al analizar la muestra por separado, dicha correlación sólo se mantuvo en el grupo control. Encontramos una correlación negativa y estadísticamente significativa entre los valores de vitamina C en plasma y el número de embriones de buena calidad ($p=0.044$), número de ovocitos maduros ($p=0.012$), y, aunque no significativa, estuvo próxima a la significación

estadística la correlación con el número de ovocitos recuperados ($p=0.077$) y el número de ovocitos fecundados ($p=0.054$).

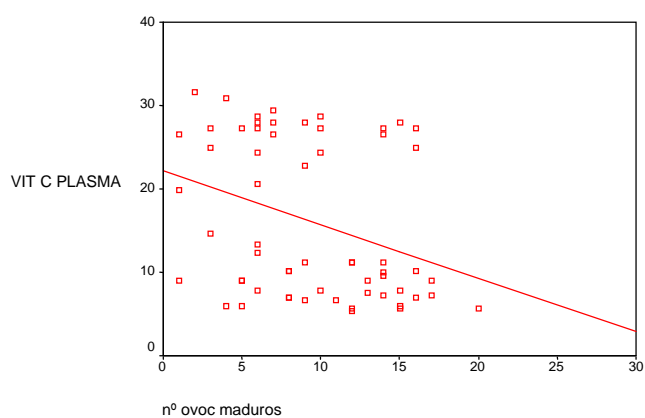
Correlación de la vitamina C en plasma con nº ovocitos recuperados en el grupo control



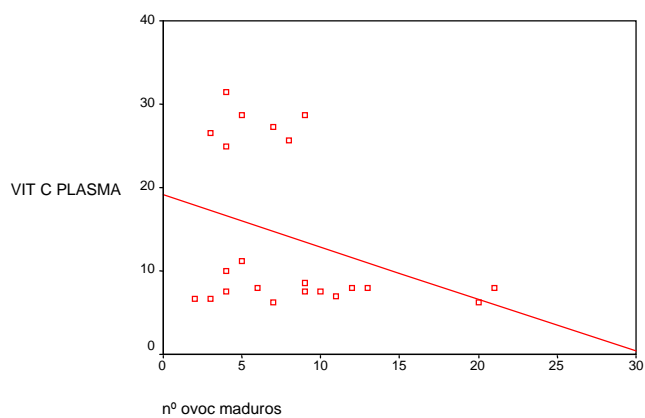
Correlación de la vitamina C en plasma con nº ovocitos recuperados en los casos



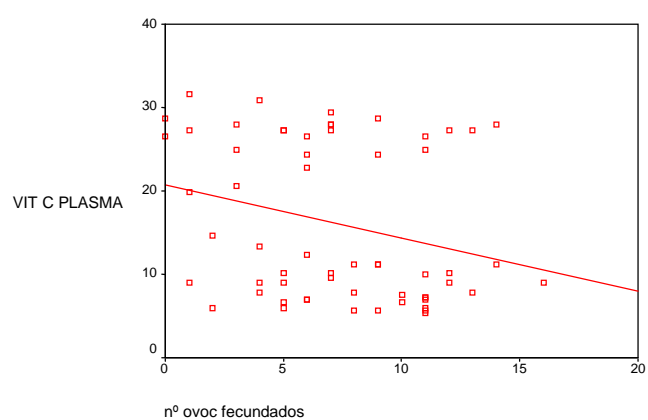
Correlación de la vitamina C en plasma con nº ovocitos maduros en el grupo control



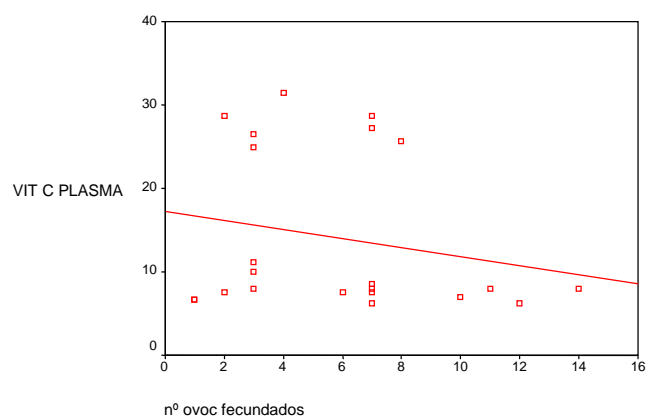
Correlación de la vitamina C en plasma con nº ovocitos maduros en los casos



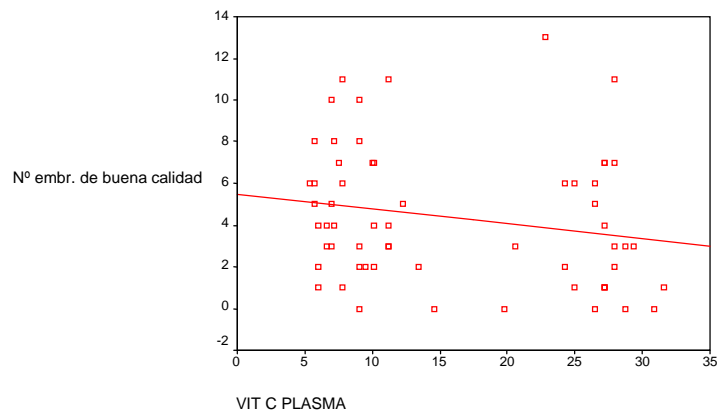
Correlación de la vitamina C en plasma con nº ovocitos fecundados en el grupo control



Correlación de la vitamina C en plasma con nº ovocitos fecundados en los casos



Correlación de la vitamina C en plasma con nº embriones de buena calidad en grupo control



Con respecto a los valores de la vitamina C en el LF, no encontramos correlación con ninguno de los parámetros de éxito de las técnicas de FIV, estando en todos los casos el coeficiente de correlación muy próximo a cero.

Correlación de la vitamina C con los marcadores de los resultados de las técnicas de FIV en el conjunto global de la muestra

		Nº embriones	Nº embriones de buena calidad	Tasa implantación	Nº Ovoc recuperados	Nº Ovoc maduros	Nº Ovoc fecundados
Vit C Plasma	Coeficiente correlación*	-0.167	-0.211	-0.003	-0.232	-0.298	-0.221
	Significación estadística	p=0.133	p=0.057	p=0.978	p=0.036	p=0.007	p=0.046
Vit C LF	Coeficiente correlación*	-0.018	-0.067	0.033	-0.062	-0,110	-0.046
	Significación estadística	p=0.872	p=0.547	p=0.780	p=0.578	p=0.320	p=0.682

*Coeficiente de correlación de Spearman

Correlación de la vitamina C con los marcadores de los resultados de las técnicas de FIV por grupos

		Nº embriones	Nº embriones de buena calidad	Tasa implantación	Nº Ovoc recuperados	Nº Ovoc maduros	Nº Ovoc fecundados
Vit C plasma (0)	Coeficiente correlación*	-0.167	-0.261	0.042	-0.230	-0.324	-0.250
	Significación estadística	p=0.201	p=0.044	p=0.772	p=0.077	p=0.012	p=0.054
Vit C plasma (1)	Coeficiente correlación*	-0.092	-0.029	-0.181	-0.159	-0.200	-0.093
	Significación estadística	p=0.684	p=0.899	p=0.432	p=0.481	p=0.371	p=0.679
Vit C LF (0)	Coeficiente correlación*	-0.40	-0.132	0.003	-0.90	-0.180	-0.095
	Significación estadística	p=0.758	p=0.309	p=0.983	p=0.492	p=0.165	p=0.464
Vit C LF (1)	Coeficiente correlación*	0.082	0.028	0.097	-0.009	-0.009	0.035
	Significación estadística	p=0.716	p=0.903	p=0.675	p=0.968	p=0.968	p=0.877

*Coeficiente de correlación de Spearman

0= grupo control

1= casos

5.3 Superóxido dismutasa

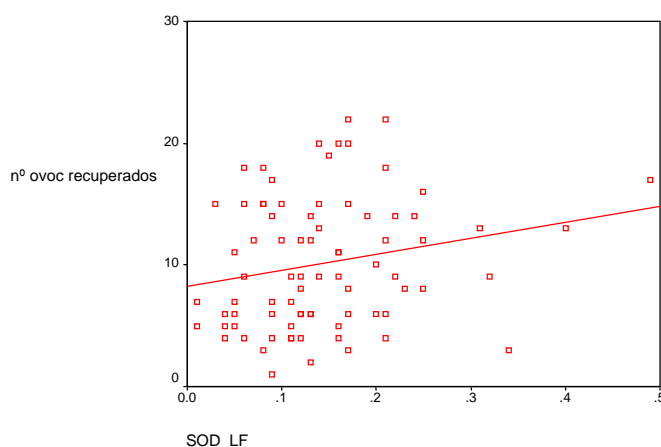
No encontramos ninguna correlación entre los niveles de SOD en **PLASMA** y ninguno de los parámetros que usamos para valorar el resultado de las técnicas de FIV. En todos los casos el coeficiente de correlación estaba muy próximo a cero (Rho de Spearman, $p > 0.05$).

Cuando analizamos los valores de la SOD en ambos grupos por separado, encontramos unos resultados similares (Rho de Spearman, $p > 0.05$).

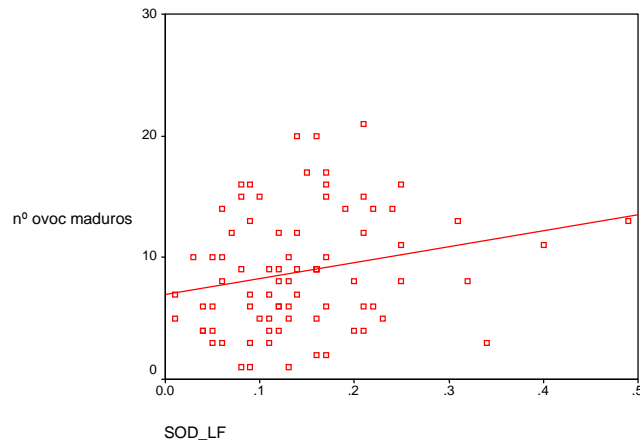
Con respecto a la SOD en LÍQUIDO FOLICULAR, encontramos una correlación positiva con el número de ovocitos recuperados, maduros y fecundados, que fue estadísticamente significativa en el caso del número de ovocitos maduros ($p = 0.023$). En el caso del número de ovocitos recuperados y fecundados, aunque no fue estadísticamente significativa, estuvo próxima a la significación estadística ($p = 0.053$ y $p = 0.054$, respectivamente).

Con el resto de los parámetros no encontramos correlación.

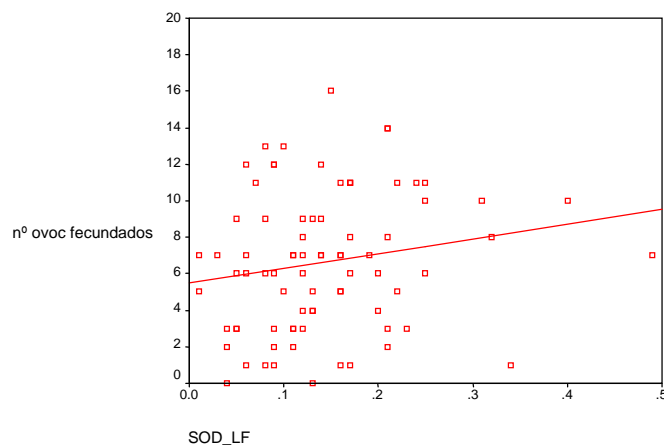
Correlación de la SOD en LF con nº ovocitos recuperados en el conjunto global de la muestra



Correlación de la SOD en LF con nº ovocitos maduros en el conjunto global de la muestra



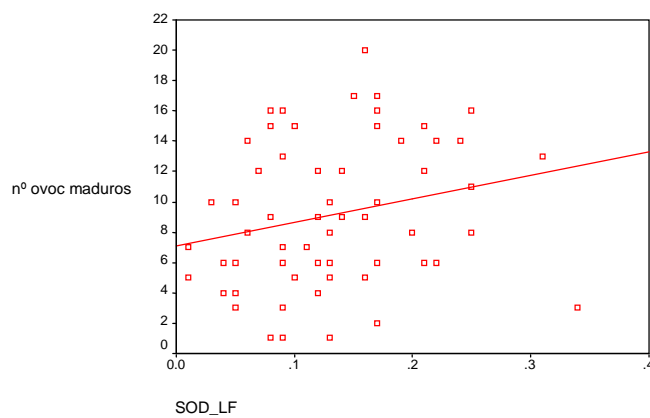
Correlación de la SOD en LF con nº ovocitos fecundados en el conjunto global de la muestra



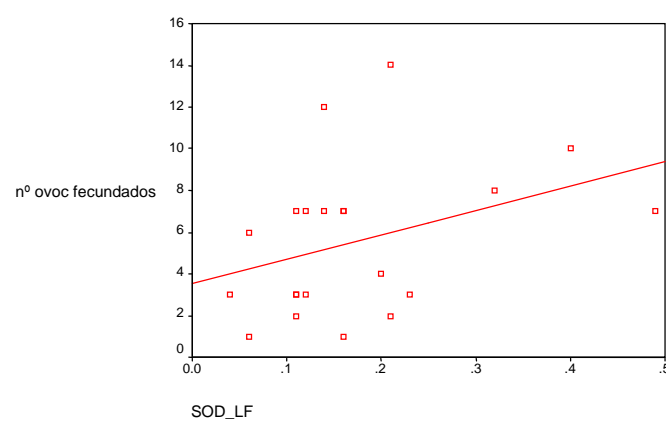
Cuando analizamos la correlación de la SOD en líquido folicular por grupos, sólo encontramos que se mantenía una correlación positiva y significativa ($p=0.041$) en el grupo control con el número de ovocitos maduros,

y en los casos, aunque no estadísticamente significativa, estuvo muy próximo a la significación estadística la correlación (positiva) entre la SOD en LF y el número de ovocitos fecundados ($p=0.053$).

Correlación de la SOD en LF con nº ovocitos maduros en el grupo control



Correlación de la SOD en LF con nº ovocitos fecundados en los casos



Correlación de la SOD con los marcadores de los resultados de las técnicas de FIV en el conjunto global de la muestra

		Nº embriones	Nº embriones de buena calidad	Tasa implantación	Nº Ovoc recuperados	Nº Ovoc maduros	Nº Ovoc fecundados
SOD Plasma	Coeficiente correlación*	0.034	0.002	-0.71	-0.047	-0.041	0.014
	Significación estadística	p=0.759	p=0.984	p=0.548	p=0.671	p=0.715	p=0.903
SOD LF	Coeficiente correlación*	0.203	0.192	0.032	0.217	0.254	0.217
	Significación estadística	p=0.071	p=0.088	p=0.793	p=0.053	p=0.023	p=0.054

*Coeficiente de correlación de Spearman

Correlación de la SOD con los marcadores de los resultados de las técnicas de FIV por grupos

		Nº embriones	Nº embriones de buena calidad	Tasa implantación	Nº Ovoc recuperados	Nº Ovoc maduros	Nº Ovoc fecundados
SOD plasma (0)	Coeficiente correlación*	-0.40	-0.108	-0.262	-0.046	-0.080	-0.087
	Significación estadística	p=0.760	p=0.408	p=0.061	p=0.724	p=0.542	p=0.506
SOD plasma (1)	Coeficiente correlación*	0.216	0.252	0.296	-0.128	-0.090	0.203
	Significación estadística	p=0.334	p=0.258	p=0.192	p=0.572	p=0.689	p=0.364
SOD LF (0)	Coeficiente correlación*	0.172	0.210	-0.003	0.201	0.267	0.190
	Significación estadística	p=0.194	p=0.111	p=0.983	p=0.127	p=0.041	p=0.149
SOD LF (1)	Coeficiente correlación*	0.409	0.189	0.095	0.380	0.362	0.428
	Significación estadística	p=0.066	p=0.411	p=0.690	p=0.089	p=0.107	p=0.053

*Coeficiente de correlación de Spearman

0= grupo control

1= casos

5.4 Lipoperóxidos (MDA)

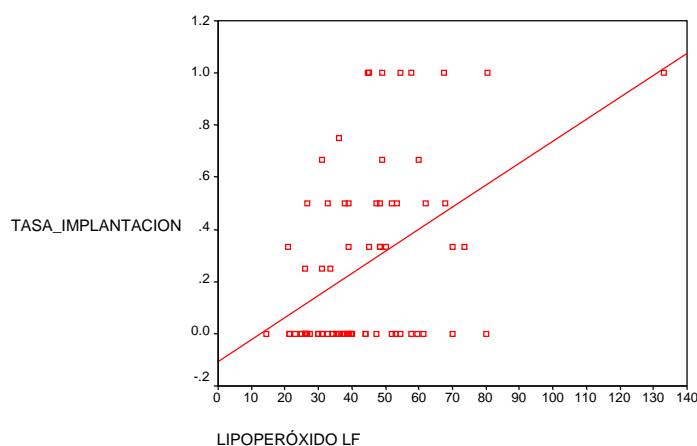
Como parámetro para medir el estrés oxidativo hemos usado los lipoperóxidos, tanto en plasma como en LF.

Hemos correlacionado también sus valores con el número ovocitos recuperados, maduros y fecundados y con el número de embriones, embriones de buena calidad y tasa de implantación.

No hemos encontrado correlación con los MDA en plasma y ninguno de estos parámetros, al analizar el conjunto global de la muestra. Tampoco hallamos correlación alguna cuando analizamos la muestra por separado en ambos grupos.

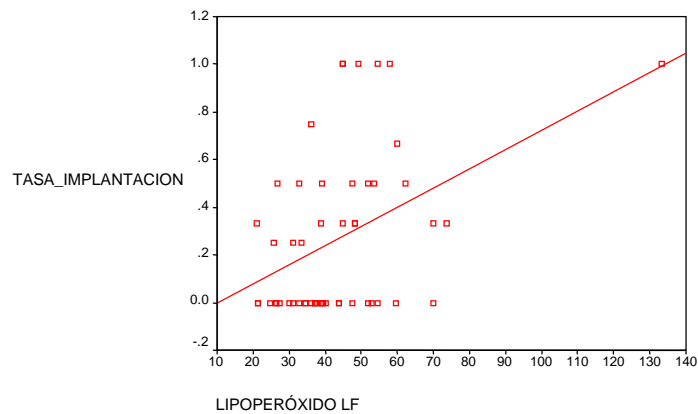
Sólo encontramos una correlación positiva y estadísticamente significativa entre los valores de MDA en LF y la tasa de implantación ($p=0.0001$).

Correlación de los MDA en LF con la tasa de implantación en el conjunto global de la muestra

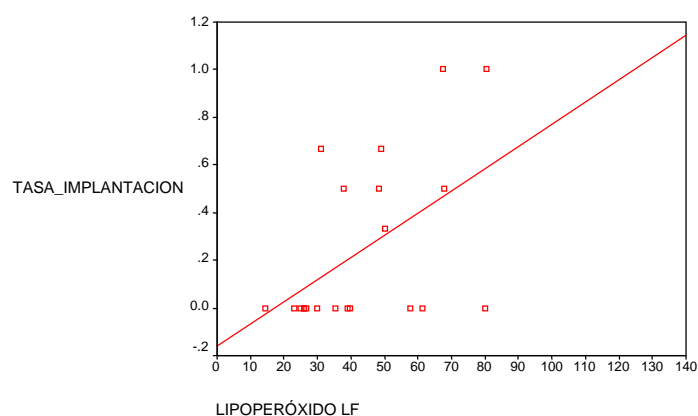


Al realizar el análisis por grupos, dicha correlación positiva se mantuvo de forma significativa tanto en el grupo control ($p= 0.005$), como en los casos ($p=0.020$).

Correlación de los MDA en LF con la tasa de implantación en el grupo control



Correlación de los MDA en LF con la tasa de implantación en los casos



Correlación de los MDA con los marcadores de los resultados de las técnicas de FIV en el conjunto global de la muestra

		Nº embriones	Nº embriones de buena calidad	Tasa implantación	Nº Ovoc recuperados	Nº Ovoc maduros	Nº Ovoc fecundados
MDA Plasma	Coeficiente correlación*	0.006	-0.033	-0.013	0.063	0.031	-0.011
	Significación estadística	p=0.954	p=0.767	p=0.914	p=0.569	p=0.781	p=0.918
MDA LF	Coeficiente correlación*	0.027	0.015	0.415	-0.040	-0.038	0.057
	Significación estadística	p=0.806	p=0.894	p=0.0001	p=0.719	p=0.735	p=0.609

*Coeficiente de correlación de Spearman

Correlación de los MDA con los marcadores de los resultados de las técnicas de FIV por grupos

		Nº embriones	Nº embriones de buena calidad	Tasa implantación	Nº Ovoc recuperados	Nº Ovoc maduros	Nº Ovoc fecundados
MDA plasma (0)	Coeficiente correlación*	-0.067	-0.106	-0.070	0.063	-0.028	-0.089
	Significación estadística	p=0.609	p=0.418	p=0.620	p=0.631	p=0.829	p=0.495
MDA plasma (1)	Coeficiente correlación*	0.094	0.057	0.120	-0.119	-0.025	0.058
	Significación estadística	p=0.677	p=0.802	p=0.604	p=0.598	p=0.911	p=0.798
MDA LF (0)	Coeficiente correlación*	0.085	0.059	0.388	0.069	0.035	0.128
	Significación estadística	p=0.514	p=0.652	p=0.005	p=0.595	p=0.788	p=0.324
MDA LF (1)	Coeficiente correlación*	-0.092	-0.077	0.505	-0.289	-0.249	-0.140
	Significación estadística	p=0.684	p=0.734	p=0.020	p=0.193	p=0.263	p=0.533

*Coeficiente de correlación de Spearman

0= grupo control

1= casos

TABLAS RESUMEN DE LOS RESULTADOS

			ENDOMETRIOSIS	CONTROL	P
ANTIOXIDANTES	Vit. E ($\mu\text{g/ml}$)	Suero	8,13 \pm 3,80	5,20 \pm 3,22	0,001
		LF	4,32 \pm 1,45	4,30 \pm 1,51	NS
	Vit. C ($\mu\text{g/ml}$)	Suero	14,10 \pm 9,58	15,40 \pm 9,13	NS
		LF	9,79 \pm 6,95	12,78 \pm 5,93	0,003
	SOD (U/ml)	Suero	0,55 \pm 0,74	0,93 \pm 1,43	0,059
		LF	0,17 \pm 0,11	0,13 \pm 0,07	NS
ROS	MDA ($\mu\text{g/ml}$)	Suero	46,05 \pm 29,18	57,62 \pm 44,20	NS
		LF	43,11 \pm 19,99	42,25 \pm 16,90	NS

Tabla 1. Valores de los antioxidantes y ROS en LF y suero de pacientes con endometriosis y pacientes sin endometriosis

			Ovocitos recuperados	Ovocitos maduros	Ovocitos fecundados	Ovocitos conseguidos	Embriones Buena calidad	Tasa de implantación
ANTIOXIDANTES	Vit. E	Suero	NO	NO	NO	NO	NO	NO
		LF	NO	NO	NO	NO	NO	NO
	Vit. C	Suero	- (p=0,036)	- (p=0,007)	- (p=0,046)	NO	- (p=0,057)	NO
		LF	NO	NO	NO	NO	NO	NO
	SOD	Suero	NO	NO	NO	NO	NO	NO
		LF	+ (p=0,053)	+ (p=0,023)	+ (p=0,054)	NO	NO	NO
ROS	MDA	Suero	NO	NO	NO	NO	NO	NO
		LF	NO	NO	NO	NO	NO	+ (p=0,0001)

Tabla 2. Correlaciones entre los antioxidantes y ROS con los parámetros usados para valorar el resultado de las técnicas de FIV

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

Con frecuencia, en las pacientes con endometriosis tenemos que recurrir a TRA para conseguir una gestación. Estas técnicas ofrecen en estas pacientes una alta tasa de éxito cuando el tratamiento de la endometriosis fracasa.

No obstante, los resultados de los diversos estudios al respecto son dispares, y aunque algunos encuentran peores resultados en las técnicas de FIV/ICSI en pacientes con endometriosis[50, 51], otros autores no logran demostrar diferencias en los resultados de FIV en estas pacientes[18, 52, 53].

La endometriosis es una enfermedad muy común y aún hoy desconocida. Es más, muy probablemente no se trate de una única enfermedad sino de varios tipos diferentes de una misma entidad, con orígenes y fisiopatologías que no necesariamente tienen que ser comunes. Lo que sí está claro es que, hasta no conocer completamente su etiopatogenia, difícilmente se podrá encontrar una solución para esta patología tan frecuente.

Son muchas las teorías que se barajan para explicar el origen de la endometriosis, y entre ellas, una que ha cobrado un especial interés en los últimos años ha sido la influencia del estrés oxidativo en la génesis y progresión de la enfermedad. Parece que un desbalance entre las moléculas pro-oxidantes y antioxidantes, que tan necesarias son para la correcta función celular, podría contribuir al desarrollo de la misma. Aún no está claro si este desbalance es previo al desarrollo de la enfermedad o bien una consecuencia, ni tampoco qué moléculas en concreto son las que presentan una expresión diferencial en los distintos estadios de la

enfermedad. Es por esto por lo que nos decidimos a estudiar más a fondo este aspecto de esta interesante patología.

1. CARACTERÍSTICAS DE LA MUESTRA

Para valorar la homogeneidad de nuestra muestra tuvimos en cuenta diversos factores que sabemos que actúan como variables independientes a las variables objeto de nuestro estudio, pero que pueden influir en el resultado de las técnicas de reproducción asistida.

Del total de la muestra (91 pacientes), 23 configuraban el grupo de casos, lo que supone un 25.4% del total, y 68 (74.6%) el grupo control. Nuestro grupo control incluía tanto pacientes infértiles por factor masculino (14.3%), factor tubárico (4,4%), EOD (37.4%) o causa mixta (3.3%), como pacientes sanas donantes de ovocitos (15.4%).

Aquí asumimos la primera limitación de nuestro estudio. Si el estrés oxidativo se asocia a esterilidad independientemente de padecer endometriosis, el hecho de incluir a pacientes con esterilidad de origen desconocido en nuestro grupo control puede confundirnos al estudiar la posible relación entre el estrés oxidativo y la endometriosis. No obstante, según Jackson et al no existen diferencias significativas con respecto a los resultados entre pacientes con EOD y pacientes con esterilidad de causa tubárica [45], lo que nos animó a incluir a estas pacientes en el grupo control.

1a. Edad de las pacientes

Sabemos que la edad de la mujer es uno de los factores más importantes que influyen en el éxito de los resultados de las TRA. En nuestro estudio, ambos grupos fueron comparables en cuanto a la edad, con una edad media en el grupo control de 30.8 años y de 33.6 años entre los casos.

1b. Edad del varón

Tampoco hubo diferencias significativas en la edad de la pareja, con una edad media de 36.1 años entre los casos y de 38.3 años en el grupo control, si bien sabemos que la edad del varón no es un factor tan determinante como la edad de la mujer en los procedimientos de reproducción asistida.

1c. Años de esterilidad

Los dos grupos de la muestra también fueron homogéneos respecto a los años de esterilidad (2.9 años en los casos vs 3.3 años en el grupo control).

1d. Gestaciones previas

Como cabía esperar, sí encontramos diferencias en las gestaciones previas. En el grupo control, el 31.6% habían tenido al menos una gestación previa, mientras que sólo el 8.7% de las mujeres con endometriosis habían tenido una gestación previa y ninguna había llegado a término.

Los resultados no sorprenden, pues en el grupo control estamos incluyendo pacientes sanas, como las donantes de ovocitos, así como casos de muy buen pronóstico (factor tubárico, por ejemplo).

Además, estos resultados concuerdan perfectamente con los hallazgos de otros autores. Diversas evidencias apoyan que, efectivamente, la endometriosis afecta negativamente a la fertilidad. En primer lugar, se ha demostrado una disminución en las tasas de embarazo en las mujeres con endometriosis sometidas a TRA [50, 51, 54]. Por otro lado, se diagnostica endometriosis por laparoscopia en una proporción más alta de mujeres estériles que de mujeres fértiles [55, 56].

No hay duda de que en la endometriosis moderada-severa, los factores mecánicos ejercen un efecto negativo sobre la fertilidad, dificultando el tránsito tubárico. Es por ello por lo que no sorprende el hallazgo de antecedentes de

embarazo ectópico entre los casos. Las adherencias peritoneales y alteración tubárica es casi una constante en estos grados de enfermedad y la posibilidad de un embarazo ectópico está aumentado en estas pacientes [51, 56].

1e. Hábito tabáquico

El tabaco se ha asociado con un efecto adverso sobre la función ovárica directamente relacionado con la dosis de tabaco consumida, así como con el tiempo de consumo. En un metaanálisis realizado por Shiverick et al, el riesgo de infertilidad en pacientes fumadoras fue significativamente mayor (OR 1.60 [IC 1.34-1.91]). Estos mismos autores demostraron que la exposición a nicotina en el interior del folículo aumentaba la peroxidación lipídica [26, 57].

En nuestra muestra recogimos este dato de la historia clínica de la paciente, y no encontramos diferencias en el hábito tabáquico entre ambos grupos, por lo que el impacto del tabaco en el estrés oxidativo de nuestras pacientes fue repartido por igual.

Por tanto, podemos concluir que nuestra muestra fue homogénea en cuanto a edad de las pacientes y su pareja, años de esterilidad y hábito tabáquico.

2. TRATAMIENTOS EMPLEADOS EN LA ESTIMULACIÓN OVÁRICA

En nuestro estudio se emplearon tanto en los casos como en el grupo control, tres protocolos de tratamiento para la estimulación ovárica con gonadotropinas.

En ambos grupos el protocolo más utilizado fue el protocolo largo con agonistas, pero los tres protocolos fueron empleados en porcentajes similares tanto en mujeres con endometriosis como en los controles.

No se ha demostrado que para pacientes con endometriosis exista un protocolo que ofrezca mejores resultados que otro. Así, Pabuccu et al en diversos trabajos, no encuentra diferencias en cuanto a la tasa de implantación y tasa de embarazo con el uso de agonistas o antagonistas en pacientes con endometriosis moderada y endometriomas [58, 59].

En la misma línea encontramos los resultados del Instituto Valenciano de Infertilidad (IVI) al analizar los ciclos de FIV/ICSI en pacientes con endometriosis entre enero de 2000 y diciembre de 2006 [60], no influyendo el protocolo usado en los resultados del ciclo.

Aunque generalmente en estas pacientes se use como primera elección el protocolo con antagonistas, ya que el protocolo con agonistas puede producir un frenado excesivo del ovario, lo que supone mayor gasto de gonadotropinas y una mayor duración de la estimulación ovárica, en un estudio realizado por este grupo que incluía 260 pacientes bajas respondedoras, no encontraron diferencias significativas en las tasas de embarazo e implantación [60]. Similares resultados encuentran otros autores, como Weitzman et al [61] y Berin et al [62].

Por tanto, aunque podríamos pensar que en las pacientes con endometriosis, especialmente aquellas que han sido sometidas a cirugía ovárica por endometriomas, y en las que se espera una baja reserva ovárica y, por tanto, una baja respuesta a la estimulación, podríamos encontrar mejores resultados con el protocolo con antagonistas, al producir una menor supresión ovárica, hoy por hoy no podemos afirmar esto. Aun así, la tendencia de muchos clínicos sigue siendo el empleo de antagonistas en pacientes sometidas a cirugía de grandes endometriomas o en las que se espera una baja respuesta ovárica.

En nuestro estudio, si bien no encontramos diferencias significativas entre ambos grupos, sí vemos que se mantiene esta tendencia, empleando en las pacientes con endometriosis con mayor frecuencia el protocolo con antagonistas.

De hecho, en nuestra experiencia en el Hospital La Paz sobre los resultados de las técnicas de FIV en pacientes con endometriosis, tampoco encontramos diferencias en los protocolos de estimulación ovárica empleados [18]. En este trabajo encontramos que se empleó el protocolo largo con agonistas en el 80% de las pacientes con endometriosis, cifras muy similares al grupo control (88%), y tampoco obtuvimos diferencias significativas en los resultados, en cuanto a tasas de implantación y de gestación [18]. Sólo se usó el antagonista en pacientes con reserva ovárica muy disminuida.

Con respecto a las dosis de FSH empleadas, tampoco hallamos diferencias significativas entre ambos grupos. Los mismos resultados los encontramos en nuestra experiencia citada anteriormente, tanto en las dosis de inicio como el consumo total de FSH [18].

Si bien, también tenemos que decir que tanto en aquel trabajo como en el presente estudio, la mayoría de las pacientes incluidas en el grupo de endometriosis eran estadios leves-moderados, donde la reserva ovárica no está muy disminuida, e incluíamos muy pocos casos de endometriosis severa, con grandes cirugías previas y en donde era de esperar una baja reserva ovárica.

En cualquier caso, sí insistimos en la necesidad de individualizar el tratamiento para cada paciente, con el objetivo de emplear el tratamiento mas idóneo y que nos permita obtener los mejores resultados.

3. RESPUESTA Y RESULTADOS DEL TRATAMIENTO

A la hora de valorar la respuesta al tratamiento tuvimos en cuenta diversos parámetros.

En primer lugar, el número de folículos mayores de 14 mm. Teniendo en cuenta aquellos folículos mayores de 14 mm de diámetro, las mujeres con endometriosis tuvieron una peor respuesta a la estimulación que las mujeres sin enfermedad.

El resto de los parámetros estudiados (ovocitos recuperados, maduros y fecundados), aunque las diferencias no fueron significativas, si fueron también peores en las mujeres con endometriosis, hallazgos lógicos por otro lado. Probablemente la significación estadística se alcanzaría con algo tan sencillo como aumentar el tamaño muestral.

Otro parámetro que estudiamos fue el **número de embriones obtenidos** y el **número de embriones de buena calidad**.

Revisando la bibliografía existente consideramos que uno de los mejores parámetros clínicos que nos serviría para valorar el efecto del estrés oxidativo (OS) en las técnicas de FIV sería valorar la calidad de los embriones obtenidos durante el programa de FIV.

El microambiente que existe en el líquido folicular juega un papel fundamental en la calidad del ovocito, que como sabemos tiene un impacto directo en la tasa de fecundación y en la calidad embrionaria.

Un exceso de ROS en el líquido folicular puede ser responsable de aneuploidias en los ovocitos fecundados, lo que daría lugar a embriones de peor calidad y unos malos resultados en FIV [26, 63-66].

En las células de la granulosa de pacientes con endometriosis se ha documentado una mayor concentración de ROS [36]. Además, el lento desarrollo

embrionario en etapas tempranas (7 células en el día +3), o la alta tasa de fragmentación (>15%) o un menor porcentaje de blastocistos morfológicamente normales, podrían estar asociados a un incremento en los niveles de ROS [67].

Por otro lado, se sabe que para alcanzar un correcto desarrollo embrionario son necesarios niveles fisiológicos de ROS [26, 31, 67]. Durante las primeras etapas del desarrollo, el embrión crece mejor sometido a bajas concentraciones de oxígeno. De este modo, una alta concentración de oxígeno durante los cultivos in vitro podría incrementar las concentraciones de H₂O₂ (agua oxigenada), responsable de la fragmentación del ADN y disminución del desarrollo embrionario.

También se ha observado una mayor tasa de fecundación cuando los ROS están en bajas concentraciones, lo que podría significar que los ROS a niveles fisiológicos son necesarios para un correcto desarrollo embrionario y normal fertilización [31, 35, 36].

En nuestra serie no hallamos diferencias en el **número de embriones** en día +2 y día +3 obtenidos en ambos grupos.

Mayor interés tiene, según hemos visto, la **calidad embrionaria**. Aunque tampoco obtuvimos diferencias significativas entre los grupos, la tendencia es hacia una peor calidad embrionaria en las mujeres con endometriosis.

Si bien la tendencia de muchos grupos es a transferir un mayor número de embriones en pacientes con endometriosis [18], nosotros no encontramos diferencias significativas en el **número de embriones transferidos y congelados**.

Finalmente, se valoró también la **tasa de gestación clínica**. Encontramos que en el grupo control fue del 46.1%, y en los casos del 34.8%, confirmándose que la endometriosis afecta negativamente a los resultados de un programa de FIV. Podemos especular que esto es debido a, como hemos comentado anteriormente, un

disbalance en el estrés oxidativo intrafolicular alteraría la calidad ovocitaria en estas mujeres.

Pero también es posible que en pacientes con endometriosis exista una menor tasa de implantación, al encontrar el embrión un endometrio menos receptivo. Se han demostrado mayores concentraciones de NO (óxido nítrico) y NOS (óxido nítrico sintetasa), ambos marcadores de estrés oxidativo, en el endometrio de pacientes con endometriosis [24, 47]. También se ha documentado mayor concentración de lipoperóxidos en el endometrio de pacientes con endometriosis [26, 68-71]. Esto podría alterar la receptividad endometrial y afectar a la implantación embrionaria. Y obviamente, estos resultados podrían ser consecuencia de la combinación de ambos factores.

También se ha barajado la posibilidad de que el estrés oxidativo pueda jugar algún papel en el **aborto**.

La implantación es un proceso muy bien regulado, que incluye una compleja interacción entre el embrión y el entorno uterino. Un exceso de estrés oxidativo durante el establecimiento de la circulación maternoembrionaria podría ser causa de pérdida gestacional. Se ha visto que el aborto espontáneo se acompaña de una significativa disrupción en el balance prooxidantes-antioxidantes [33, 72-75].

Por todo ello, se ha barajado la posibilidad de que el estrés oxidativo pueda jugar un papel en el caso de abortos recurrentes de etiología desconocida [33].

De este modo, nosotros analizamos también la **tasa de abortos** en ambos grupos, no encontrando diferencias entre ambos.

Con respecto al número de **embarazos ectópicos**, encontramos un porcentaje muy superior en las mujeres con endometriosis (8.7% vs 1.8%). Aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas, sí observamos una tendencia de casi 4 veces más gestaciones ectópicas entre los casos, lo que concuerda con una

mayor posibilidad de patología tubárica en pacientes con endometriosis. Es probable que con un mayor tamaño muestral nuestras diferencias hubieran sido significativas desde el punto de vista estadístico. Aún así, la relevancia clínica de estos hallazgos es evidente, y concuerda con la evidencia disponible [76-78].

4. ESTRÉS OXIDATIVO Y CAPACIDAD ANTIOXIDANTE EN PLASMA Y LÍQUIDO FOLICULAR

En ciclos ováricos normales se ha estudiado el estrés oxidativo mediante la cuantificación de diversos marcadores [26, 32, 34]. Se ha visto que varios de estos marcadores se encuentran en menor concentración en el LF que en plasma, lo que sugiere que el LF cuenta con una alta concentración de sistemas antioxidantes que protegen al ovocito del daño oxidativo [26].

Revisando la bibliografía, y de todos los marcadores disponibles, hemos medido como antioxidantes las **vitaminas C y E**, y la actividad de un enzima antioxidante, la **superóxido dismutasa** (SOD). Como parámetro para medir los ROS hemos analizado los **lipoperóxidos** o MDA.

El LF es el medio que baña y se encuentra en íntimo contacto con el ovocito, siendo un fiel reflejo de lo que sucede en el microambiente que rodea a éste. Es por ello que numerosos trabajos han centrado su atención en él. No tuvimos duda pues, de que uno de los medios en que íbamos a centrar nuestro estudio era el LF.

Con respecto al plasma como el otro medio objeto de nuestro estudio, fue elegido por su mayor accesibilidad a la hora de recoger las muestras, pero asumiendo las limitaciones que tendríamos a la hora de comparar los resultados con los de otros trabajos, en los que en unos se estudia el suero pero en otros con frecuencia se

estudia el líquido peritoneal, y más aún cuando hablamos de endometriosis, en la que sabemos el papel importante que se le otorga al líquido peritoneal en la patogenia de la enfermedad.

Por otro lado, el plasma puede no reflejar tan fielmente el microambiente que rodea al ovocito, dado que cualquier suplementación o aporte exógeno puede no alcanzar las mismas concentraciones, ni en el mismo tiempo, que lo que sucede en el medio que rodea al ovocito.

Comenzando con la **vitamina E**, los valores medios **en plasma** fueron mas elevados en las mujeres con endometriosis.

Nuestros hallazgos concuerdan con los encontrados por Jackson et al, que también describe mayores niveles de vitamina E en plasma en las pacientes con endometriosis [45]. Sin embargo, Szczepanska et al y Shauti et al, encuentran en mujeres con endometriosis niveles más bajos de antioxidantes, y entre ellos la vitamina E [45].

Estos hallazgos los podríamos explicar por la posibilidad de que las pacientes con endometriosis pudiesen estar sometidas a algún tipo de aporte externo con antioxidantes, ya que hay autores que tienen tendencia a dar suplementos en estas pacientes de vitamina E y vitamina C como tratamiento antioxidante, y ésta es una variable que no ha sido controlada en nuestro estudio, pero bien podría justificar los niveles más elevados de vitamina E entre los casos [33, 46, 67]. Por otro lado, tampoco hemos controlado el tipo de dieta, y sabemos que hay pacientes con endometriosis que toman una dieta rica en antioxidantes, lo que también podría influir en nuestros resultados.

Los valores de vitamina E en líquido folicular fueron en cambio, muy parecidos en ambos grupos.

La **vitamina C** es otro importante sistema antioxidante del folículo. El déficit de vitamina C produce atrofia ovárica y extensa atresia folicular, demostrando así un importante papel contra el estrés oxidativo [26, 79, 80].

A diferencia de los valores hallados para la vitamina E, los valores de vitamina C en plasma fueron muy similares en ambos grupos.

En cambio, en el líquido folicular, sí encontramos valores de vitamina C más bajos en las mujeres con endometriosis.

Nuestros resultados en este caso, están a favor de que el líquido folicular contaría con una mayor capacidad antioxidante en las pacientes sin enfermedad. En las pacientes con endometriosis, los niveles de vitamina C en LF serían menores, bien por un consumo excesivo del antioxidante en un intento de neutralizar el exceso de ROS, o quizá ese exceso de ROS se deba en parte a unos niveles inicialmente bajos de la capacidad antioxidante del LF en estas pacientes.

Diversos trabajos han estudiado la capacidad total antioxidante (TAC) del LF en pacientes con endometriosis [41, 81], así como la actividad de diversas enzimas con capacidad antioxidante, como la SOD [69, 70], pero no hemos encontrado en la literatura revisada ningún trabajo que analice únicamente la vitamina C en LF o plasma. Por tanto, no podemos contrastar nuestros resultados con los de otros autores, al no haber nada descrito hasta ahora. Únicamente se han realizado diferentes trabajos con la suplementación de vitamina C a pacientes sometidas a técnicas de FIV/ICSI, y su repercusión en los niveles de vitamina C a nivel de LF, y resultados en términos de gestación [24, 82], pero este no era el objetivo de nuestro trabajo, por lo que los resultados no son comparables.

Se ha demostrado que la **superóxido dismutasa (SOD)** está presente en el LF de nuestra especie, sugiriendo así que los ROS y SOD podrían jugar un papel en el proceso de ovulación y desarrollo ovocitario. Se sabe que la SOD es un enzima con

capacidad antioxidante, que protege al ovocito de los ROS al descomponer el ión superóxido en peróxido de hidrógeno y oxígeno [26, 61].

Estudiamos de este modo la actividad de dicha enzima, obteniendo en **plasma** una menor actividad en el grupo de mujeres con endometriosis respecto a los controles.

Aunque Tatemoto et al encuentran una mayor concentración de SOD en LF que en plasma [83], lo que estaría a favor de que el **LF** cuenta con sistemas antioxidantes propios que protegen al ovocito, nosotros encontramos en LF una menor actividad del enzima que la hallada en plasma.

Pudiera ser que con un mayor tamaño muestral, la mayor actividad del enzima en LF de las pacientes con endometriosis fuese significativa, lo cual podría reflejar la necesidad de una mayor expresión del enzima para intentar neutralizar un exceso de ROS.

O bien pudiese ser también, que el consumo en exceso del enzima, sobre expresada, por un ambiente de mayor estrés oxidativo en el LF de las pacientes con endometriosis, igualase los valores hallados para la SOD con el grupo control, donde se requeriría menor actividad enzimática al estar probablemente sometido el ovocito a un menor estrés oxidativo. Esta explicación parece más plausible en el contexto de la foliculogénesis en mujeres con endometriosis.

Como parámetro para medir los ROS usamos los **lipoperóxidos (MDA)**, dado que se ha visto que los MDA son el mejor marcador para medir la actividad metabólica dentro del folículo [31].

Los valores de MDA en **plasma** fueron comparables en ambos grupos.

También en **LF**, los valores de los MDA fueron muy similares, sin diferencias significativas.

Estos resultados se podrían justificar en el supuesto de que realmente existiese en las pacientes con endometriosis una mayor capacidad total antioxidante (TAC) en el LF en un intento de neutralizar el mayor estrés oxidativo en estas pacientes, lo que haría caer los MDA a niveles comparables a las pacientes sin enfermedad.

En este sentido están los hallazgos de Ota et al y Polak et al, que encuentran que en pacientes con endometriosis existe una sobre expresión de enzimas antioxidantes, como la catalasa, xantina oxidasa y SOD [41]. La sobre expresión de estas enzimas podría ser una respuesta a un exceso de radicales libres, en un intento de neutralizar los mismos.

Sin embargo, otros autores, como Gupta et al [24] encuentran en LP de mujeres con endometriosis una menor TAC y menor concentración de SOD que en mujeres sin endometriosis, lo que coincide con nuestros hallazgos.

Jackson et al [45] estudian diferentes marcadores de estrés oxidativo en mujeres infértiles con endometriosis y mujeres infértiles sin endometriosis, y encuentran concentraciones mayores de algunos de estos marcadores (como el malondialdeido, derivado de la peroxidación lipídica) en las pacientes con enfermedad.

En línea con nuestros hallazgos, Szczepanska et al [45] también reporta niveles menores de glutatión peroxidasa y SOD en el líquido peritoneal en pacientes con endometriosis, y mayores concentraciones de MDA. Igualmente, Shanti et al [45], encontraron en suero estos mismos hallazgos.

Lo que añade aún mas confusión a estos controvertidos hallazgos es que algunos autores no hallan diferencias en los marcadores de estrés oxidativo y TAC en pacientes con endometriosis y pacientes sin enfermedad [45, 81], como Wang et al [68] y Arumagam et al [84].

A la hora de contrastar nuestros resultados con otros estudios encontramos varias limitaciones.

En primer lugar, muchos estudian TAC y MDA y resultados de las técnicas de FIV, pero pocos comparan los hallazgos en pacientes con endometriosis con las pacientes sin enfermedad.

No todos los trabajos miden los mismos parámetros; mientras unos miden TAC, otros miden la actividad de enzimas, como la SOD...

Las muestras biológicas en que se miden son también distintas; unos miden en LP, otros en plasma y otros en LF.

La metodología empleada es muy variable, y ha cambiado a lo largo de los años.

Y por último, también existen diferencias en las pacientes incluidas (endometriosis grado I-II vs III-IV, fértiles vs infértiles), así como en la selección del grupo control.

5. CORRELACIÓN ENTRE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE Y ESTRÉS OXIDATIVO DE PLASMA Y LÍQUIDO FOLICULAR CON LOS RESULTADOS DE LAS TÉCNICAS DE FIV

En este último apartado, quisimos estudiar si existía alguna correlación entre los valores de las vitaminas C y E y el enzima SOD, como antioxidantes y los lipoperóxidos (MDA), como parámetro de estrés oxidativo y los resultados de las técnicas de FIV, para lo que analizamos el número de ovocitos recuperados, maduros y fecundados y el número de embriones, embriones de buena calidad y la tasa de implantación.

Estudiamos dicha correlación tanto en plasma como en líquido folicular, en el conjunto global de la muestra y en ambos grupos de estudio por separado.

Con respecto a la **vitamina E**, no encontramos ninguna correlación con ninguno de los parámetros, ni en plasma ni en LF, ni en el conjunto global de la muestra ni cuando analizamos los grupos por separado.

Entre los trabajos analizados en la bibliografía, no encontramos ninguno que estudie la correlación aislada de la vitamina E con alguno de estos parámetros, si bien, podemos considerar que la vitamina E, como antioxidante, vendría a formar parte de la TAC del LF.

Más controversia podemos encontrar cuando analizamos la correlación de la **vitamina C** con los resultados de las técnicas de FIV.

Curiosamente, encontramos en **PLASMA** una correlación negativa entre la vitamina C y varios de estos parámetros.

Al analizar el conjunto global de la muestra, hallamos una correlación negativa y significativa entre los valores de vitamina C en plasma y el nº de ovocitos recuperados, maduros y fecundados; esto es, para mayor concentración de vitamina C encontramos un menor nº de ovocitos recuperados, maduros y fecundados. Y, aunque no fue significativo desde el punto de vista estadístico, también se observó una correlación negativa entre la vitamina C y la calidad embrionaria.

Al estudiar la muestra por grupos, la correlación sólo se mantuvo en el grupo de mujeres sin endometriosis, siendo también una correlación negativa.

Con respecto a los valores de **vitamina C** en **LF**, no encontramos correlación con ninguno de los parámetros de éxito de las técnicas de FIV, aunque se observa una tendencia hacia la misma línea que los hallazgos en plasma.

Se sabe que la vitamina C es un potente antioxidante natural, por lo que estos hallazgos no es raro que nos sorprendan, aunque pueden tener una explicación lógica.

Es posible que las menores concentraciones de vitamina C en plasma puedan ser reflejo de un consumo en exceso de ésta para neutralizar los ROS.

Quizás también se puedan explicar porque, es sabido que, ciertos niveles de ROS son necesarios para un correcto desarrollo embrionario y ovocitario. Por tanto, un exceso de vitamina C produciría una reducción drástica en las concentraciones de ROS, que como decimos son necesarias en pequeñas concentraciones (niveles fisiológicos) para la maduración del ovocito y desarrollo del embrión [32, 33, 35].

Si miramos lo que ocurre en un modelo de cultivo in vitro del ovocito, sabemos que la adición de vitamina C al medio de cultivo del ovocito, protege al mismo del daño celular y le permite la maduración citoplasmática [35, 37, 79].

HideKi Tatemoto et al, demostraron que una concentración de 250µM de vitamina C en el medio de cultivo en ovocitos porcinos tiene efectos antiapoptóticos, y protege al ovocito del daño celular permitiendo su maduración citoplasmática. También demostraron que añadir mayores cantidades no tiene mayores efectos sobre el ovocito. Estos autores explican que la vitamina C tiene un doble efecto: uno antioxidante a bajas concentraciones y otra prooxidante a altas concentraciones. Así, parece que la acumulación de vitamina C más allá de las concentraciones óptimas podría tener efectos deletéreos en la maduración del ovocito [79].

Por tanto, nos podríamos plantear aquí, hasta qué punto se puede justificar una suplementación oral con antioxidantes como la vitamina C, y en tal caso, a qué dosis deberíamos darla para no producir una drástica reducción en los niveles de ROS, manteniendo un estrés oxidativo fisiológico.

Con respecto a los valores de la **SOD**, no encontramos ninguna correlación entre estos valores en **PLASMA** y ninguno de los parámetros antes mencionados, estando en todos los casos, el coeficiente de correlación muy próximo a cero. Similares resultados encontramos al hacer el análisis por grupos.

En **LF** sí encontramos una correlación positiva entre los valores de SOD y el nº de ovocitos recuperados, maduros y fecundados. Al realizar el análisis por grupos, vemos que dicha correlación sólo se mantiene en las mujeres sin endometriosis.

La SOD es un enzima con capacidad antioxidante, que protege al ovocito de los ROS al descomponer el ión superóxido en peróxido de hidrógeno y oxígeno [26]. La SOD se ha localizado en el ovario, en especial en las células de la teca interna. Por ello se especula que las células de la teca interna podrían proteger al ovocito del estrés oxidativo durante la maduración ovocitaria [26].

Tatemoto et al [83] confirmaron estos hallazgos en una serie de elegantes experimentos de maduración *in vitro* de ovocitos. En un modelo porcino estudiaron los efectos protectores de la SOD del LF frente al estrés oxidativo [83], y lo que encontraron fue que la adición al medio de LF durante la maduración *in vitro* de los ovocitos porcinos protegía al ovocito contra el estrés oxidativo, a través de la actividad antioxidante de enzimas como la SOD. En este estudio, la tasa de maduración fue menor cuando había mayor concentración de ROS, pero la adición al medio de LF porcino produjo un aumento en la maduración ovocitaria *in vitro*.

Existen otros estudios que avalan estos resultados. Así, Pasqualotto et al [85] y Oyawoye et al [39], estudiaron la TAC del LF y encontraron que los niveles de TAC en el LF de aquellos ovocitos que no fecundaron eran menores que los que sí fecundaron; además, los valores de la TAC fueron también menores en aquellas pacientes que no llegaron a conseguir embarazo. Todo esto iría a favor de la idea del papel protector para el ovocito del LF, debido probablemente a la presencia de sustancias antioxidantes.

Gupta et al [26, 69, 70] encuentran una menor concentración del enzima SOD en el LP de mujeres infértiles con endometriosis al compararlas con pacientes fértiles

del grupo control, lo que apoya un posible papel protector de la SOD en la función reproductiva.

Estos datos están en la línea de nuestros hallazgos, ya que como vimos, nuestras mujeres con endometriosis mostraron unos niveles más bajos de SOD que las mujeres sanas.

En cualquier caso, está claro que la capacidad antioxidante de la SOD juega un papel importante en el proceso de maduración ovocitaria, neutralizando el exceso de ROS. Así, la concentración de SOD en LF podría ser marcador de calidad o de buen pronóstico en un programa de FIV.

Lipoperóxidos o MDA

Un exceso de ROS provoca la peroxidación de los lípidos de las membranas celulares; por ello, como parámetro para medir el estrés oxidativo hemos usado los lipoperóxidos o MDA, y los medimos también tanto en plasma como en LF.

En nuestro estudio no encontramos correlación entre los **MDA en PLASMA** y ninguno de los parámetros analizados, ni en el conjunto global de la muestra, ni al analizar los grupos por separado.

Sólo encontramos una correlación positiva y estadísticamente significativa entre los valores de **MDA en LF** y la tasa de implantación; correlación que se mantuvo al realizar el análisis por grupos, tanto en el grupo control como en los casos.

Nuestros hallazgos coinciden con un gran número de trabajos que también estudian el papel del estrés oxidativo en los resultados de las técnicas de FIV [31, 35, 39, 85].

Hoy en día es evidente que el estrés oxidativo está implicado en la calidad ovocitaria y, consecuentemente, en la calidad embrionaria. Se ha visto cómo el estrés oxidativo está implicado en defectos del desarrollo y retraso del crecimiento embrionario, a través del daño en la membrana celular, daño en el ADN y apoptosis. La apoptosis produce fragmentación embrionaria, lo cual limita el potencial de implantación y podría ser responsable de malos resultados en la FIV [33].

Un desarrollo embrionario lento, una alta tasa de fragmentación y una menor formación de blastocistos morfológicamente normales se ha asociado con concentraciones elevadas de ROS en el día +1. Además, estos niveles elevados de ROS en el día +1 se han asociado también con tasas de gestación reducidas [67].

Sin embargo, también se ha visto que existe una mayor tasa de fecundación cuando los ROS no están elevados, lo que podría sugerir que los ROS a bajas concentraciones en LF son fisiológicos, y quizás necesarios para una normal fecundación [67].

Diversos autores han propuesto así que, los ROS y MDA en LF podrían ser indicadores de buen pronóstico en las técnicas de FIV [31, 86].

En la misma línea que nuestros resultados están los estudios de Pasqualotto et al [85] y Attaran et al [86] recogidos en la exhaustiva revisión realizada por Gupta [26]. Estos autores encuentran que las pacientes que llegaron a conseguir embarazo tras FIV o ICSI tuvieron mayores niveles de MDA y TAC en LF, y guardaron una correlación positiva con la tasa de embarazo. De hecho, en las pacientes que no quedaron embarazadas las concentraciones de ROS fueron menores.

Resultados similares han sido descritos por otros grupos de investigación [85] [33].

Agarwal et al [32] también encontraron que las mujeres que lograron quedar embarazadas tuvieron mayores niveles de ROS en LF, y las mujeres con endometriosis que llegaron a quedar embarazadas tuvieron también niveles significativamente mayores de ROS que las que no quedaron embarazadas [32]. Así parece que los ROS en LF en bajas concentraciones podría ser un marcador de buen pronóstico en pacientes sometidas a un programa de FIV.

En un tema tan controvertido como el estrés oxidativo, y como era de esperar, encontramos también resultados contradictorios. Así, Das et al [38] no encuentran esta asociación entre los niveles de MDA y TAC y la maduración ovocitaria, calidad embrionaria, fecundación o tasa de implantación [38]. Incluso Attaran et al [86] y Jozwik et al (1999) encuentran una correlación negativa entre los niveles de ROS en LF y la calidad embrionaria o la tasa de implantación.

Sin embargo, como hemos ido viendo, nuestros resultados no siempre son fáciles de comparar con los obtenidos en los diferentes estudios publicados, y con frecuencia encontramos resultados discordantes. Ello es debido a que, con frecuencia, en los distintos estudios se utilizan diferentes criterios, que hacen que no sean homogéneos.

Así, por ejemplo, mientras unos analizan simplemente la capacidad total antioxidante (TAC) [36, 39, 85], otros, como nosotros, analizan una actividad enzimática en concreto (como la SOD) o los valores de vitaminas antioxidantes (como la vitamina C o la vitamina E) [26, 80, 83].

Por otro lado, también existen diferencias en la selección del grupo control, pues algunos toman como grupo control pacientes sanas, mientras otros toman pacientes infértiles por otras causas distintas a la endometriosis.

Los marcadores de estrés oxidativo y las muestras biológicas en que se miden difieren también mucho entre los distintos estudios (líquido peritoneal, líquido folicular, suero...).

La metodología empleada oscila, cambiando desde las técnicas entre sí como los Kits de detección dentro de una misma técnica.

Y por último, en otras ocasiones las diferencias no se pueden demostrar por el pequeño tamaño muestral, lo que reduce la significación de los resultados.

De todo ello podemos concluir que el papel de los ROS en la reproducción humana, aún sin estar del todo claro, parece que podría jugar un papel diferente en la maduración ovocitaria y las distintas fases del desarrollo embrionario. Una cierta cantidad de ROS es crítica en el folículo para la maduración ovocitaria, y es crítica también para un correcto desarrollo embrionario, mientras que altas concentraciones de ROS afectan a la fertilización y embarazo.

Por tanto, son necesarios niveles fisiológicos de ROS a nivel folicular para asegurar un buen pronóstico reproductivo. Las concentraciones de ROS y TAC en LF podrían ser así indicadores de buen pronóstico en las técnicas de FIV en un futuro cercano.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. Encontramos concentraciones menores de vitamina C en el LF de las pacientes con endometriosis comparado con las pacientes sin enfermedad.
2. Las concentraciones de SOD en plasma de las pacientes con endometriosis fueron menores que en las pacientes sin enfermedad.

Ambos hallazgos sugieren que en las pacientes con endometriosis está disminuida la capacidad antioxidante.

3. No observamos diferencias significativas en las concentraciones de MDA entre ambos grupos de pacientes, si bien, la tendencia es una mayor concentración en plasma en el grupo control, lo que sería reflejo de que es necesario un cierto nivel de estrés oxidativo para una correcta función reproductiva.
4. Encontramos una correlación positiva entre los niveles de SOD en LF y el nº de ovocitos recuperados, maduros y fecundados. Esto sugiere que la capacidad antioxidante de la SOD juega un papel importante en el proceso de maduración ovocitaria, neutralizando el exceso de ROS. Así, la SOD en LF podría ser un marcador de buen pronóstico reproductivo.
5. Encontramos una correlación negativa entre los valores de vitamina C en plasma y el nº de ovocitos recuperados, maduros y fecundados, y el nº de embriones de buena calidad. Esto podría reflejar un consumo en exceso de la vitamina C en un intento de neutralizar un exceso de ROS y mantener unos

niveles fisiológicos de ROS que permitan una adecuada maduración ovocitaria y desarrollo embrionario.

6. Existe una correlación positiva entre los niveles de MDA en LF y la tasa de implantación, lo que podría indicar que los ROS a bajas concentraciones son fisiológicos y quizás necesarios para una normal fecundación. Así, parece que los ROS en bajas concentraciones en LF podría ser un marcador de buen pronóstico en pacientes sometidas a un programa de FIV.
7. Parece que una cierta cantidad de ROS es crítica en el folículo para la maduración ovocitaria, y es crítica también para un correcto desarrollo embrionario, mientras que altas concentraciones de ROS afectan a la fertilización y embarazo. Por tanto, son necesarios niveles fisiológicos de ROS a nivel folicular para asegurar el éxito de la FIV. Las concentraciones de ROS y TAC en LF podrían ser así indicadores de buen pronóstico en las técnicas de FIV.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

1. Vigano P, P.f., et al, *Endometriosis: epidemiology and aetiological factors*. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol, 2004. **Apr; 18(2)**: p. 177-200.
2. Treolar SA, et al, *Genetic influences on endometriosis in an Australian twin sample*. Fertil Steril, 1999. **Apr; 71(4)**: p. 701-10.
3. Hanfield RM, M.H., *Endometriosis in monozygotic twins*. Fertil Steril, 1997. **Nov; 68(5)**: p. 941-2.
4. Treolar SA, W.J., et al, *Genomewide linkage study in 1,176 sister pair families identifies a significant susceptibility locus for endometriosis on chromosome 10q26*. Am J Hum Genet, 2005. **Sep; 77(3)**: p. 365-76.
5. Zondervan KT, T.S., *Significant evidence of one or more susceptibility loci for endometriosis with near-Mendelian inheritance on chromosome 7p13-15*. Hum Reprod, 2007. **Mar; 22(3)**: p. 717-28.
6. Matorras R, R.F,et al, *Epidemiology of endometriosis in infertile women*. Fertil. Steril., 1995. **Jan; 63(1)**: p. 34-38.
7. Vercellini P, D.G.O., et al, *Menstrual characteristics in women with and without endometriosis*. Obstet Gynecol., 1997. **Aug; 90(2)**: p. 264-8.
8. Nap AW, G.P., *Pathogenesis of endometriosis*. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol, 2004. **Apr; 18(2)**: p. 233-44.
9. Peter GA, Hompes P.G., *Endometriosis: the way forward*. Gynecol Endocrinol, 2007. **Jan; 23(1)**: p. 5-12.
10. Dunselman GA, G.P., *The mesothelium, Teflon or Velcro?. Mesothelium in endometriosis pathogenesis*. Hum Reprod, 2001. **Apr; 16(4)**: p. 605-607.
11. Witz CA., *Pathogenesis of endometriosis*. Gynecol Obstet Invest, 2002. **1**: p. 52-62.

12. Witz CA, A.K., et al, *Pathogenesis of endometriosis-current research*. Hum Fertil (Camb), 2003. **Feb; 6(1)**: p. 34-40.
13. Nair AS, Nair HB., *Modeling the early endometriotic lesion: mesothelium-endometrial cell co-culture increases endometrial invasion and alters mesothelial and endometrial gene transcription*. Fertility and Sterility, 2007. **26 (Dec)**.
14. Dmowski WP, G.H., *Decreased apoptosis and sensitivity to macrophage mediated cytolysis of endometrial cells in endometriosis*. Human Reprod Update, 1998. **Sep-Oct; 4(5)**: p. 696-701.
15. Dmowski WP, D.J., *Apoptosis in endometrial glandular and estromal cells in women with and without endometriosis*. Hum Reprod, 2001. **Sep; 16(9)**: p. 1802-8.
16. Braun DP., et al. *Quantitative expression of apoptosis-regulating genes in endometrium from women with and without endometriosis*. Fertility and Sterility, 2007. **Feb; 87(2)**: p. 263-8.
17. Fauconnier A, C.C., *Relation between pain sytoms and the anatomic location of deep infiltrating endometriosis*. Fertility and Sterility, 2002. **Oct; 78(4)**: p. 719-26.
18. Prieto Sánchez L., *Resultado de las técnicas de fecundación in vitro en pacientes con endometriosis*. Revista Iberoamericana de Fertilidad, 2005. **Mayo-Junio 22; (3)**: p. 249-258.
19. Stephen Kennedy, A.B., et al, *ESHRE guideline for the diagnosis and treatment of endometrisis*. Hum Reprod, 2005. **20(10)**: p. 2698-2704.
20. García Velasco JA., *Medical treatment of endometriosis*. Minerva Ginecol, 2005. **57**: p. 1-7.
21. Mounsey AL, W.A., *Diagnosis and management of endometriosis*. American Family Physician, 2006. **Aug; 74(4)**.

22. *Medical management of the endometriosis*. British Medical Journal, 1977(May). **6070**: p. 1175-76.
23. Attar E, B.S., *Aromatase inhibitors: the next generation of therapeutics for endometriosis?* Fertil Steril, 2006. **May; 85(5)**: p. 1307-18.
24. Gupta S., et al, *Oxidative stress and the pathogenesis of endometriosis*. Center for Reproductive Medicine, Glickman Urological and Kidney Institute and Obstetrics Gynecology and women`s Health Institute; Cleveland Clinic
25. Falconer H., et al, *Effects of anti-TNF-mAb treatment on pregnancy in baboons with induced endometriosis*. Fertility and Sterility, 2007. **30(Ago)**.
26. Gupta S, L.S., *The impact of oxidative stress on female reproduction and art: and evidence based review*. 2008.
27. Ferrero S., *Future perspectives in the medical treatment of endometriosis*. Obstet Gynecol Surv, 2005. **Dec; 60(12)**: p. 817-26.
28. Piotrowski PC., *Statins inhibit growth of human endometrial stromal cells independently of cholesterol availability*. Biol Reprod, 2006. **Jul; 75(1)**: p. 107-11.
29. García Velasco JA., *Management of endometriomas in women requiring IVF: to touch or not to touch*. Human Reproduction 2009. **1(1)**: p. 1-6.
30. Banwell KM, L.M., *Oxygen concentration during mouse oocyte in vitro maturation affects embryo and fetal development*. Hum Reprod, 2007. **22(10)**: p. 2768-75.
31. Stefan S du Plessis, et al, *Impact of oxidative stress on IVF*. Expert Rev. Obstet. Gynecol, 2008. **3(4)**: p. 539-54.
32. Agarwal A., *Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction*. Fertil Steril, 2003. **Apr; 79(4)**: p. 829-43.
33. Agarwal A, G.S., *The role of free radicals and antioxidants in reproduction*. Curr Opin Obstet Gynecol, 2006. **Jun; 18(3)**: p. 325-32.

34. Agarwal A, G.S., *Oxidative stress and its implications in female infertility-a clinician`s perspective*. Reprod Biomed Online, 2005. **Nov; 11(5)**: p. 641-50.
35. Agarwal A, et al, *Role of free radicals in female reproductive diseases and assisted reproduction*. Reprod Biomed Online, 2004. **Jul; 9(3)**: p. 330-47.
36. Agarwal A, et.al, *Impact of oxidative stress on gametes and embryos in ART laboratory*. The Clinical Embriologist. **9(3)**: p. 1-11.
37. Krajcir N., *Female infertility and assisted reproduction: impact of oxidative streess*. Current women`s health reviews, 2008. **4**: p. 9-15.
38. Das S, C.R., *Reactive oxygen species level in follicular fluid-embryo quality marker in IVF?* Hum Reprod, 2006. **21(9)**: p. 2403-07.
39. Oyawoye O, et al, *Antioxidants and reactive oxygen species in follicular fluid of women undergoing IVF: relationship to outcome*. Hum Reprod, 2003. **Nov; 18(11)**: p. 2270-4.
40. Van Langendonckt A, et al, *Oxidative stress and peritoneal endometriosis*. Fertil Steril, 2002. **May; 77(5)**: p. 861-70.
41. Agarwal A., *Role of oxidative stress in endometriosis*. Reprod Biomed Online, 2006. **May; 13(1)**: p. 126-133.
42. Foyouzi N, et al, *Effects of oxidants and antioxidants on proliferation of endometrial stromal cells*. Fertil Steril, 2004. **Oct; 82(3)**: p. 1019-22.
43. Murphy AA, P.W., *Evidence for oxidatively modified lipid-protein complexes in endometrium and endometriosis*. Fertil Steril, 1998. **Jun; 69(6)**: p. 1092-2004.
44. Shanti A, S.N., *Autoantibodies to markers of oxidative stress are elevated in women with endometriosis*. Fertil Steril, 1999. **Jun; 71(6)**: p. 1115-8.
45. Jackson LW, S.E., *Oxidative stress and endometriosis*. Hum Reprod, 2005. **20; (7)**: p. 2014-20.
46. Wan-Jun Choi, et al, *Oxidative stress and tumor necrosis factor-alpha-induced alterations in metaphase II mouse oocyte spindle structure*. Fertil Steril, 2007. **Oct; 88(2)**: p. 1220-31.

47. JianHua Wang, M., et al, *Prolonged gonadotropin-releasing hormone agonist therapy reduced expression of nitric oxide synthase in the endometrium of women with endometriosis and infertility*. Fertil Steril, 2006. **Apr; 85(4)**: p. 1037-44.
48. Bedaiwy MA., *Peritoneal fluid environment in endometriosis. Clinicopathological implications*. Minerva Ginecol, 2003. **Aug; 55(4)**: p. 333-45.
49. García Velasco JA, et al, *Ultrasonography of pelvic endometriosis*. Ultrasonography in Reproductive Medicine and Infertility, 2010. **ed Botros R.M.B.Rizk. Cambridge University Press**.
50. Wardle PG., *Endometriosis and ovulatory disorder: reduced fertilisation in vitro compared with tubal and unexplained infertility*. Lancet 1985. **3 (Ago); 2(8449)**: p. 236-9.
51. Chillik, C., *Efectos de la endometriosis en los resultados de reproducción asistida*. Revista Iberoamericana de Fertilidad **XXV Congreso Nacional de la SEF**.
52. Antoine JM., *Endometriosis and fertility: physiopatology and treatment options*. Contracept Fertil Sex, 1995. **Feb. 23(2)**(93-96).
53. Mahutte NG., *Endometriosis and assisted reproductive technologies: are outcomes affected?* Curr Opin Obstet Gynecol, 2001. **Jun; 13(3)**: p. 275-9.
54. Barnhart K., *Effect of endometriosis on in vitro fertilization*. Fertility and Sterility, 2002. **77**: p. 1148.
55. Speroff, L., *Endocrinología ginecológica e infertilidad*. 2006 (7ª Ed): p. 1103-1125.
56. Garcia Velasco JA., *Endometriosis en Reproducción*. Actualizaciones de la SEF. 2000, 200.
57. Shiverick KT, et al, *Cigarette smoking and pregnancy: ovarian, uterine and placental effects*. Placenta, 1999. **20(4)**: p. 265-272.

58. Pabuccu R, et.al, *Comparison of GnRh Agonist and Antagonist protocols among patients with mild-moderate endometriosis and endometrioma: a novel clinical approach*. Fertility and Sterility, 2005 (Sep). **84(1)**: p. 197-8.
59. Recai Pabuccu, G.O., Cenil Kaya, *GnRH agonist and antagonist protocols for stage I-II endometriosis and endometrioma in in vitro fertilization/ICSI cycles*. Fertility and Sterility, 2007 (oct). **88(4)**: p. 832-39.
60. Remohi J., Bellver J., *Manual practico de esterilidad y reproducción humana*. McGraw Hill, 2008 (3ªEd).
61. Weitzman, et al, *Comparison of luteal estradiol patch and gonadotropin-releasing hormone antagonist suppression protocol before gonadotropin stimulation vs microdose gonadotropin-releasing hormone agonist protocol for patiens with a history of poor in vitro fertilization outcomes*. Fertility and Sterility, 2009 (Jul). **92(1)**: p. 226-30.
62. Berin I, et al, *A comparison of gonadotropin-releasing hormone (GnRh) antagonist and GnRh agonist flare protocols for poor responders undergoing in vitro fertilization*. Fertility and Sterility, 2010(Feb). **93(2)**: p. 360-3.
63. Guerin P, et al, *Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its sorrounding*. Human Reproduction Update, 2001. **7(2)**(175-89).
64. Harvey AJ., *Redox regulation of early embryo developement*. Reproduction, 2002. **123(4)**: p. 479-86.
65. Warren JS, et al, *Oxygen radicals in cell injury and cell death*. Pathol Immunopathol Res, 1987. **6(5-6)**: p. 301-15.
66. Machaty, et al, *Inhibitors of mitochondrial ATP production at the time of compaction improve development of in vitro produced porcine embryos*. Mol Reprod Dev., 2001. **58(1)**: p. 39-44.
67. Mohamed A, et al, *Differential growth of human embryos in vitro: role of reactive oxygen species*. Fertil Steril, 2004. **Sep; 82(3)**: p. 593-600.

68. Wang Y., *Importance of reactive oxygen species in the peritoneal fluid of women with endometriosis or idiopathic infertility*. Fertility and Sterility, 1997. **68**: p. 826-30.
69. Polak, et al, *Total antioxidant status of peritoneal fluid in infertile women*. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2001. **94(2)**: p. 261-3.
70. Szczepanska M, et al, *Oxidative stress may be a piece in the endometriosis puzzle*. Fertil Steril, 2003. **June; 79(6)**: p. 1288-93.
71. Ho HN, et al, *Total antioxidant status and nitric oxide do not increase in peritoneal fluids from women with endometriosis*. Human Reproduction, 1997. **12(12)**: p. 2810-15.
72. Gupta S, A.A., *The role of oxidative stress in spontaneous abortion and recurrent pregnancy loss: a systematic review*. Obstetrical and Gynecological Survey, 2007. **62(5)**: p. 335-47.
73. Simsek M, et al, *Blood plasma levels of lipoperoxides, GP, betacarotene, vitamine A and E in women with habitual abortion*. Cell Biochem Funct, 1998. **16**: p. 227-31.
74. Safranov V, et al, *Changes in regulation of oxidase activity of peripheral blood granulocytes in women with habitual abortions*. Bull Exp Biol Med, 2003. **136**: p. 257-60.
75. Vural P, et al, *Antioxidant defence in recurrent abortion*. Clin Chim Acta, 2000. **295**: p. 169-177.
76. Bogdanskieve G, et al, *Association between ectopic pregnancy and pelvic endometriosis*. Int J Gynaecol Obstet, 2006 (Feb). **92(2)**: p. 157-8.
77. Brodowska A, et al, *Analysis of risk factors for ectopic pregnancy in own material in the years 1993-2002*. Pol Merkur Lekarski, 2005(Jan). **18(103)**: p. 74-7.
78. Elstein M., *Tubal disease and fertility outcome*. Reprod Biomed Online, 2008(Feb). **16(2)**: p. 167-9.

79. Tatemoto H, et al, *Enhancement of developmental competence after in vitro fertilization of porcine oocytes by treatment with ascorbic acid 2-O-alpha-glucoside during in vitro maturation*. Biology of reproduction, 2001. **65**: p. 1800-06.
80. Dalvit G, et al, *Effect of alpha-tocopherol and ascorbic acid on bovine oocyte in vitro maturation*. Reprod Domest Anim, 2005. **40(2)**: p. 93-7.
81. Sajal, G., *Antioxidants and female reproductive pathologies*. Arch Med Sci, 2009. **5(1A)**: p. 151-153.
82. Grha I, H.D., *Ascorbic acid and infertility treatment*. Cent Eur J Public Health, 2003. **Jun; 11(2)**: p. 63-7.
83. Tatemoto H, M.N., *Protection of porcine oocytes against cell damage caused by oxidative stress during in vitro maturation: role of superoxide dismutase activity in porcine follicular fluid*. Biology of reproduction, 2004. **71**: p. 1150-57.
84. Arumagam K., *Endometriosis and infertility: the role of exogenous lipid peroxides in the peritoneal fluid*. Fertility and Sterility, 1995. **63**: p. 198-9.
85. Pasqualotto E, A.A., et al, *Effect of oxidative stress in follicular fluid on the outcome of assisted reproductive procedures*. Fertil Steril, 2004. **April; 81(4)**: p. 973-76.
86. Attaran M, P.E., *The effect of follicular fluid reactive oxygen species on the outcome of in vitro fertilization*. Int J Fertil, 2000. **45(5)**: p. 314-20.